

ENTWICKLUNG EINES IMMUNCHEMISCHEN NACHWEISVERFAHRENS FÜR CEFQUINOM

JOHANNES THAL

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde,
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. Usleber

Entwicklung eines immunchemischen Nachweisverfahrens
für Cefquinom

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
JOHANNES THAL
Tierarzt aus Klausenburg

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. E. Usleber

PD. Dr. P. Becher

Tag der Disputation: 09.11.2006

Meinen Eltern
in Dankbarkeit und Bewunderung

ERKLÄRUNG

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Hemmstoffe bzw. Rückstände von Antiinfektiva in Milch	3
2.2	Rechtliche Grundlagen	5
2.3	Charakterisierung von Cefquinom	8
2.3.1	Allgemeines zu β -Laktamantibiotika bzw. zu Cephalosporinen	8
2.3.2	Gesundheitliche und technologische Risiken durch Rückstände von β -Laktamantibiotika in Lebensmitteln tierischen Ursprungs	13
2.3.2.1	Gesundheitliche Risiken für den Verbraucher	13
2.3.2.2	Technologische Risiken	15
2.3.3	Eigenschaften und therapeutische Anwendung von Cefquinom	17
2.3.3.1	Chemisch-physikalische Eigenschaften	17
2.3.3.2	Therapeutischer Einsatz von Cefquinom in der Veterinärmedizin	17
2.3.3.3	Pharmakologische Eigenschaften von Cefquinom, Bewertung durch die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA) sowie Rückstandsbildung in Milch	20
2.4	Nachweisverfahren für Cefquinom in Milch	23
2.4.1	Mikrobiologische Nachweisverfahren	23
2.4.2	Rezeptorbindungstests	27
2.4.3	Enzymatischer Test	29
2.4.4	Immunologische Verfahren	30
2.4.5	Physikalisch-chemische Nachweisverfahren	32
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	36
3.1	Material und Geräte	36
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	36
3.1.2	Antibiotika	37

	Seite	
3.1.3	<i>Puffer und Lösungen</i>	38
3.1.4	<i>Immunreagentien</i>	38
3.1.5	<i>Geräte und sonstige Materialien</i>	38
3.1.6	<i>Probenmaterial</i>	39
3.2	Methodik	40
3.2.1	<i>Herstellung der Immunreagenzien</i>	40
3.2.1.1	Kopplung mittels Glutardialdehydkondensation (GA)	41
3.2.1.2	Kopplung mittels wasserlöslichem Carbodiimid (CD)	42
3.2.1.3	Kopplung mittels Carbonyldiimidazol (CDI)	44
3.2.1.4	Kopplung mittels reduktiver Alkylierung unter Verwendung von Natrium-Perjodat (PJ)	45
3.2.1.5	Kopplung mittels para-Benzoquinon (BQ)	46
3.2.1.6	Charakterisierung der hergestellten Cefquinom-Konjugate	47
3.2.2	<i>Gewinnung spezifischer Anti-Cefquinom-Antiseren</i>	48
3.2.2.1	Immunisierung	48
3.2.2.2	Blutentnahme und Serumgewinnung	48
3.2.2.3	Kontrolle des Immunisierungsverlaufs	49
3.2.2.4	Auswahl geeigneter Antiseren durch parallele kompetitive Titration (Hemmtitration)	49
3.2.3	<i>Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntests (Doppelantikörpertechnik)</i>	50
3.2.3.1	Durchführung	51
3.2.3.2	Optimierung der Nachweisempfindlichkeit	51
3.2.3.3	Ermittlung der Standardkurvenparameter	53
3.2.4	<i>Entwicklung eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests</i>	53
3.2.4.1	Durchführung	54
3.2.4.2	Optimierung der Nachweisempfindlichkeit	54
3.2.4.3	Ermittlung der Standardkurvenparameter	56
3.2.4.4	Ermittlung der Spezifität der Enzymimmuntests	56
3.2.5	<i>Versuche zur Anwendbarkeit des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests</i>	57

	Seite
4	ERGEBNISSE 59
4.1	Herstellung der Immunreagenzien 59
4.2	Gewinnung spezifischer Antiseren gegen Cefquinom 61
4.2.1	<i>Antikörper-Titerverlauf</i> 61
4.3	Auswahl geeigneter Antiseren 62
4.4	Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntests 63
	(Doppelantikörpertechnik)
4.4.1	<i>Überprüfung und Optimierung der Nachweisempfindlichkeit</i> 63
4.5	Entwicklung eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests 66
4.5.1	<i>Testsensitivität</i> 66
4.6	Ermittlung der Spezifität 71
4.7	Anwendbarkeit des kompetitiven indirekten 72
	Enzymimmuntests zum Nachweis von Cefquinom in Milch
5	DISKUSSION 76
5.1	Anforderungen an ein immunchemisches Testsystem 76
	für Cefquinom
5.2	Antikörper gegen Cefquinom und Entwicklung 77
	enzymimmunchemischer Nachweisverfahren
5.3	Anwendbarkeit des Enzymimmuntests 80
6	ZUSAMMENFASSUNG 82
7	SUMMARY 84
8	LITERATURVERZEICHNIS 86
ANHANG I	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen 121
ANHANG II	Verzeichnis der Abkürzungen 126

1 EINLEITUNG

Der Einsatz von Antibiotika bei lebensmittelliefernden landwirtschaftlichen Nutztieren und die damit verbundene Rückstandsproblematik sind im Hinblick auf den vorbeugenden Verbraucherschutz und die technologische Qualität der Rohstoffe in der Lebensmittelherstellung von besonderer Bedeutung. Unter den zur antimikrobiellen Therapie bei laktierenden Kühen eingesetzten Antibiotika spielen nach wie vor die β -Laktamantibiotika die wichtigste Rolle, wie die tägliche Praxis der „Hemmstoff“-Kontrollen im Rahmen der Milchgüteverordnung zeigt.

Neben den klassischen Penicillinen werden bei Milchkühen in zunehmendem Maße Stoffe aus der Gruppe der Cephalosporine eingesetzt, darunter auch der Wirkstoff Cefquinom. Präparate, die diesen Wirkstoff enthalten, sind auch aufgrund ihrer relativ kurzen Wartezeiten für den Milcherzeuger anwendungsrelevant. Die Rückstandshöchstmenge (Maximum Residue Limit, MRL) für Cefquinom in Milch liegt nach Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 bei 20 $\mu\text{g/kg}$. Zwar wird Cefquinom mit den gebräuchlichen mikrobiologischen Verfahren, wie sie beispielsweise im Rahmen der Hemmstoffkontrollen eingesetzt werden, qualitativ miterfasst, allerdings erst deutlich über dem MRL-Niveau. Zudem ist eine Identifizierung und Quantifizierung von Cefquinom mittels dieser Hemmstofftests nicht möglich.

Grundsätzlich ist jedoch für viele Fragestellungen, insbesondere auch für die rechtliche Bewertung möglicher Rückstände in Konsummilch, nicht nur eine pauschale Untersuchung auf Hemmstoffe erforderlich, sondern auch eine Mengenbestimmung des Wirkstoffs. Zudem liegen aufgrund der unzureichenden Empfindlichkeit des Hemmstofftests keine verlässlichen Daten zur tatsächlichen Vorkommenshäufigkeit von Cefquinom in der Anlieferungsmilch im Hinblick auf das MRL-Niveau vor. Ausreichend empfindliche physikalisch-chemische Verfahren für Cefquinom wurden zwar von mehreren Autoren beschrieben, aufgrund des hohen Arbeits- und Kostenaufwandes werden diese jedoch derzeit in der Routineuntersuchung praktisch nicht eingesetzt.

Es besteht daher ein Bedarf an spezifischen und empfindlichen Screening-Tests, die zudem noch einfach und wirtschaftlich in der Anwendung sein sollten. Eine Möglichkeit ist hier der Cefquinom-Nachweis mit immunchemischen Verfahren. Ein solcher Test könnte, in

Verbindung mit weiteren Schnelltestsystemen, im Rahmen eines integrierten Nachweissystems eine wertvolle Ergänzung darstellen. Hierbei werden verschiedene Testsysteme hintereinander geschaltet und damit Vorteile der jeweiligen Systeme optimal genutzt. Für Cefquinom wurden bisher keine immunchemischen Verfahren beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Antikörper gegen Cefquinom herzustellen und ein enzymimmunologisches Verfahren zum quantitativen Nachweis dieses Cephalosporins in Milch zu entwickeln und zu validieren.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Hemmstoffe bzw. Rückstände von Antiinfektiva in Milch

Antiinfektiva, insbesondere Antibiotika sind die häufigste Ursache für Rückstände von Tierarzneimitteln in Anlieferungsmilch. Hier wiederum stehen seit Jahrzehnten Stoffe aus der Gruppe der β -Laktamantibiotika im Vordergrund (GEDEK, 1977; MITCHELL et al., 1998; MORETAIN und FROGER, 1995; SCHÄLLIBAUM, 1986a; SUHREN, 2002; SUHREN et al., 1996b; SUHREN und REICHMUTH, 1998b). Die prozentuale Vorkommenshäufigkeit solcher - pauschal als Hemmstoffe bezeichneten - Rückstände in Anlieferungsmilch ist zwar relativ gering und liegt in den letzten Jahren zumeist im Bereich zwischen 0,05% und 0,1%, wie die Jahresberichte verschiedener Kontrollstellen ausweisen. Berücksichtigt man jedoch die Untersuchungshäufigkeit, die beispielsweise allein in Bayern bei ca. 2,5-3 Millionen Probenuntersuchungen liegt (MILCHPRÜFRING BAYERN e.V., 2005), so bedeuten auch 0,04% positive Befunde immer noch weit über tausend Hemmstoff-positive Befunde pro Jahr. In Hessen wurden im Untersuchungsjahr 2003 0,11 % der Anlieferungsmilch-Proben Hemmstoff-positiv getestet (GOLINSKI et al., 2003).

Bezogen auf ganz Deutschland sind somit jährlich schätzungsweise 5000-6000 Hemmstoff-positive Anlieferungsmilchproben zu erwarten. Selbst wenn jeder positiven Probe beispielsweise nur 1000 Liter Milch zugrunde liegen sollten, was bei einem Betrieb mit 30-50 Milchkühen annähernd der mittleren täglichen Milchablieferung entsprechen würde, so gelangte damit jährlich Hemmstoff-haltige Milch in einer Größenordnung von 5-6 Millionen Liter in die Molkereien. Durch Verdünnung im Tankwagen mit der Milch anderer Betriebe kann die Rückstandskonzentration unter Umständen unter die Erfassbarkeitsgrenze der in der Molkerei üblichen β -Laktam-Schnelltests sinken, woraus das Risiko eines kontinuierlichen Eintrags von Antibiotika in die Milch im Spurenbereich erwächst. Da auch die Kontrolluntersuchungen im Rahmen der Milchgüterverordnung lediglich retrospektiven Charakter haben, d.h. Hemmstoff-positiv getestete Anlieferungsmilch in der Regel der normalen Be- und Verarbeitung zugeführt wird, ist hier keine vollständige Vermeidung von Antibiotika-Rückständen möglich.

Zum Nachweis von Antibiotika in Milchproben werden in der Regel mikrobiologische Hemmstofftests eingesetzt. Der Begriff „Hemmstoffe“ leitet sich von der Beobachtung ab,

dass einige Wirkprinzipien Mikroorganismen am Wachstum hindern können (GEDEK, 1986; TERPLAN und ZAADHOF, 1967). In der Praxis unterscheidet man Hemmstoffe durch den Weg des Eintrages in die Milch über einen sekretorische oder postsekretorischen Eintrag. Sekretorische Kontamination liegt vor, wenn Hemmstoffe über den Stoffwechsel des Tieres in die Milch ausgeschieden werden, z.B. antimikrobiell wirksame Substanzen bei Nichteinhaltung der Wartezeit (KNAPPSTEIN et al., 2003a+b). Aber auch andere antimikrobiell wirksame Agenzien, beispielsweise Futterinhaltsstoffe oder natürlich in der Milch enthaltene Abwehrstoffe, wie Lysozym, Laktoferrin und das Laktoperoxidase-Thiocyanat-Peroxid-System können unter Umständen eine sekretorische Hemmstoffwirkung verursachen (BJÖRCK und HOPKIN, 1994; BOOTH und HARDING, 1986; CARLSSON und BJÖRCK, 1987; KIRST, 1992), obwohl dies aufgrund der Ergebnisse der täglichen Praxis von Hemmstoffuntersuchungen die absolute Ausnahme darzustellen scheint.

Postsekretorisch entsteht eine Kontamination mit Hemmstoffen durch – versehentliches - Vermischen der Milch behandelter Kühe, oder durch Kontamination bzw. Verschleppung über nicht ausreichend gereinigte Melkgerätschaften (FABRE et al., 1995; GEDEK, 1973; MITCHELL et al., 1998; MORETAIN und FROGER, 1995; SCHÄLLIBAUM, 1986a; SCHÄLLIBAUM 1989; SUHREN et al., 1996a; SUHREN und REICHMUTH, 1998b). Seltener können auch Desinfektions- und Reinigungsmittel, bedingt durch technische Mängel der Melkanlagen oder Fehler bei der Bedienung der Melkanlagen, als Ursache für Hemmstoffe in Frage kommen (BRENTROP und ALBERS, 1995; GEDEK, 1984; TERPLAN und ZAADHOF, 1967).

Wie den Jahresberichten aller der mit Hemmstoffkontrollen im Rahmen der Milchgüteverordnung befassten Untersuchungsstellen zu entnehmen ist, können jedoch heute Hemmstoff-Rückstände praktisch mit Rückständen antimikrobiell wirksamer Tierarzneimittel gleichgesetzt werden (MILCHPRÜFRING BAYERN e.V., 2005). Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass mit den gebräuchlichen Hemmstofftests ein durch die Sensitivität und Spezifität der eingesetzten Methoden limitiertes - und damit möglicherweise unvollständiges - Abbild der Belastungssituation vermittelt wird (KROLL, 1999). Wirkstoffe, die mit diesen Methoden nicht oder nur unzureichend erfasst werden, stellen im Hinblick auf die wahre Rückstandsbelastung von Anlieferungsmilch einen in

seiner Bedeutung nur schwer abzuschätzenden Faktor dar (KLEIN, 1999; PERRETEN et al., 1997).

Die Häufigkeit des Vorkommens von Antibiotikarückständen in Konsummilch scheint, vermutlich bedingt durch Verdünnungseffekte, sehr niedrig zu liegen, obwohl neuere publizierte Daten nicht verfügbar sind. LOCHBIHLER et al. (1995) untersuchten 1992/1993 insgesamt 800 Konsummilchproben aus Bayern und fanden nur in drei Proben mittels Brillantschwarz-Reduktionstest Hinweise auf Hemmstoffe, wobei nur in einer Probe Penicilline nachgewiesen wurden. Im Hemmstoff-Labor der Professur für Milchwissenschaften wird seit 5 Jahren, zumeist mehrmals pro Woche, pasteurisierte Konsummilch aus dem Handel als Negativkontrolle für den Hemmstoff-Test eingesetzt. Bisher ergaben sich erst in einer dieser Milchproben Hinweise auf Penicillin-Rückstände (USLEBER, persönliche Mitteilung).

2.2 Rechtliche Grundlagen

Verschiedene europäische und nationale Rechtsvorschriften dienen dem Schutz des Verbrauchers vor hemmstoffbelasteten Lebensmitteln aus Milch bzw. dem Schutz der Molkerei vor unerwünschten Hemmstoff-Rückständen in Anlieferungsmilch (SCHMITT, 2002). Dabei wurde die sogenannte Nulltoleranz gegenüber Arzneimittelrückständen in Lebensmitteln tierischer Herkunft aufgrund des analytischen Fortschrittes durch Höchstmengen ersetzt (JÜLICHER, 1992; PETZ, 1993). Höchstmengenfestsetzungen (Maximum Residue Limit, MRL) erfolgten EU-weit bisher für rund 50 Antibiotika (TEUFEL, 2003) nach Verordnung (EWG) 2377/90. Zahlreiche weitere EU-Verordnungen beziehen sich auf diese Höchstmengen, beispielsweise die Verordnungen (EG) 852/2004 und (EG) 853/2004, auch §10 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches verweist auf Verordnung 2377/90. Für Cefquinom wurden seit 1995 sukzessive Höchstmengen („final MRL“) nach Anhang I der Verordnung (EWG) 2377/90 für Markergewebe der Spezies Rind (auch laktierend), Schwein und Pferd festgelegt (siehe Tabelle 1) (EMEA, 2003b).

Tabelle 1: Höchstmengen (Maximum Residue Limit, MRL) für Cefquinom in Lebensmitteln tierischen Ursprungs nach Verordnung (EWG) Nr. 2377/90, Anhang I

Spezies bzw. MRL					
Rind	MRL	Schwein	MRL	Pferd	MRL
Muskel	50 µg/kg	Muskel	50 µg/kg	Muskel	50 µg/kg
Fett	50 µg/kg	Haut+Fett	50 µg/kg	Fett	50 µg/kg
Leber	100 µg/kg	Leber	100 µg/kg	Leber	100 µg/kg
Niere	200 µg/kg	Niere	200 µg/kg	Niere	200 µg/kg
Milch	20 µg/kg				

Lebensmittelunternehmer, d.h. in diesem Zusammenhang Betriebe, die Milch be- oder verarbeiten, aber auch der milcherzeugende Landwirt, müssen im Rahmen ihrer betrieblichen Eigenkontrollen die Einhaltung der Rechtsvorschriften bezüglich Tierarzneimittelrückständen sicherstellen. Auf Erzeugerebene bedeutet dies vor allem die Anwendung von Antibiotika unter Kontrolle eines Tierarztes, die Einhaltung der entsprechenden Wartezeiten, die Führung eines Bestandsbuches (mit Dokumentation des Arzneimitteleinsatzes) sowie die Vermeidung einer sekundären Kontamination.

Der Verantwortlichkeit der Molkerei entsprechen die heute praktisch durchgehend durchgeführten β -Laktam-Schnelltests auf Tankwagenebene vor Abpumpen der Milch in den Stapeltank. Der wirtschaftliche Schaden für die Molkerei durch β -Laktam-positive Tankinhalte kann dabei beträchtlich sein, da neben dem Wert der Rohmilch (meist 20-30 Tausend Liter) die Entsorgung des Inhalts eines mit Arzneimitteln kontaminierten Tankwagens nur noch über eine kostenaufwendige Verbrennung in dafür zugelassenen Entsorgungseinrichtungen möglich ist. Die früher übliche Entsorgung in beliebigen landwirtschaftlichen Biogasanlagen ist aufgrund der Einstufung hemmstoffhaltiger Milch als Material der Kategorie 2 (enthält Rückstände antibakterieller Stoffe nach Richtlinie 96/22 (EG) Anhang I Gruppe B Nummer 1) gemäß Artikel 5 der EU-Verordnung (EG) 1774/2002 nicht mehr uneingeschränkt möglich, da nach Artikel 15 derselben Verordnung nur zugelassene Betriebe eine derartige Entsorgung durchführen dürfen.

Die Hemmstoffprüfung der Anlieferungsmilch im Rahmen der Milchgüte-Verordnung ist *de facto* eine Überprüfung auf Antiinfektiva (Antibiotika bzw. Sulfonamide). Derzeit wird Anlieferungsmilch in fast allen Bundesländern viermal pro Monat auf Hemmstoffe geprüft, wobei der Zeitpunkt der Kontrolle dem Landwirt nicht bekannt ist. Nach Milchgüte-Verordnung wären lediglich zwei Untersuchungen je Monat vorgeschrieben. Die mit Hemmstoff-positiven Befunden verbundenen Milchgeldabzüge (5 Cent je kg für den gesamten Monat des positiven Befundes) sind, bei einem Netto-Auszahlungspreis von deutlich weniger als 30 Cent pro kg, ein sehr erheblicher wirtschaftlicher Verlust für den Landwirt.

Schließlich müssen nach Richtlinie 96/23/EWG staatliche Rückstandskontrollen aller Lebensmittel auf Antibiotika durchgeführt werden, wobei eine Identifizierung und Quantifizierung der Wirkstoffe erforderlich ist. Die Probennahme, der Umgang mit den Proben und die Anforderungen an die Analyseverfahren sind in Artikel 15 dieser Richtlinie und in der Entscheidung 97/747/EG genauer beschrieben.

Im §10 des deutschen Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) ist verankert, dass Lebensmittel, die mit Stoffen mit pharmakologischer Wirkung behaftet sind, nur bei Nichtüberschreitung eines bestimmten Grenzwertes in den Verkehr gebracht werden dürfen. Die Verordnungen (EG) 852/2004 ff. heben die bis Ende 2005 gültige Milchverordnung weitgehend auf, betriebseigene und behördliche Kontrollen im Sinne der Rückstandskontrolle von Rohmilch sowie in Milch be- und verarbeitenden Betrieben sind aber weiterhin von besonderer Bedeutung. Gemäß den Vorschriften des Arzneimittelgesetzes müssen Halter von lebensmittelliefernden Tieren ein Bestandsbuch führen, in dem die ordnungsgemäße Anwendung von Arzneimitteln dokumentiert wird. Behandelnde Tierärzte müssen einen Arzneimittel-Anwendungs- und Abgabebeleg mit der Angabe der einzuhaltenden Wartezeit ausfüllen und den Halter über diese aufklären.

2.3 Charakterisierung von Cefquinom

2.3.1 Allgemeines zu β -Laktamantibiotika bzw. zu Cephalosporinen

Der Einsatz antibakterieller Substanzen hat eine lange Geschichte. Nach FRIEDRICH und MÜLLER-JAHNKE (1996) setzte man laut dem „Papyrus Ebers“ aus dem 16. Jahrhundert vor Christus den Schimmel vom Schädel toter Menschen therapeutisch ein. Aus China liegen Berichte aus der Zeit um 1000 v. Chr. über die Anwendung schimmigen Sojabreis zur Wundbehandlung vor. Auch aus Europa gibt es geschichtliche Zeugnisse, hier wurde schimmeliges Brot benutzt. Lange glaubten die Menschen an die so genannte Miasmenlehre. Dieser zu Folge entstanden Krankheiten angeblich über Ausdünstungen des Bodens, des Wassers oder von Sumpfgebieten oder durch krankmachende Bestandteile der Luft. Diese Auffassung wurde erst im 19. Jahrhundert durch Pasteur und Koch widerlegt. Sie beschrieben erstmals einzellige Mikroorganismen und ihren Zusammenhang mit der Entstehung bakterieller Erkrankungen. Daraus ergab sich die Grundlage für den Einsatz antibakterieller Substanzen (FRIEDRICH und MÜLLER-JAHNKE, 1996).

1929 entdeckte Alexander Fleming die antibakteriellen Eigenschaften des Pilzes *Penicillium notatum* (FLEMING, 1929). Durch die Forschung weiterer Wissenschaftler, wie Florey, Chain, Heatley und Abraham konnte Penicillin als erstes Antibiotikum, bereits zur Zeit des 2. Weltkriegs, eingesetzt werden. Bis zur Aufklärung der Strukturformel 1949 wurden noch viele weitere Analoga des Penicillins entdeckt. 1945 bekamen Fleming, Florey und Chain als Begründer der modernen Antibiotikatherapie den Nobelpreis.

BROTZU entdeckte 1948 auf Sardinien in der Nähe einer Kläranlage einen Pilz, *Acremonium chrysogenum* (= *Cephalosporium acremonium*), mit der Fähigkeit, eine antibiotisch wirkende Substanz zu produzieren. 1955 gelang es Guy G. F. Newton und Edward P. Abraham erstmals in einer Kultur dieses Pilzes neben dem schon bekannten Penicillin eine weitere β -Laktamstruktur zu isolieren, das Cephalosporin C (ABRAHAM, 1983). 1962 wurde die Struktur dieser Substanz aufgeklärt und ein Jahr später erstmals die 7-Amino-Cephalosporansäure, das Grundgerüst der Cephalosporine, technisch hergestellt (ABRAHAM und NEWTON, 1961; MORIN et al., 1962). In den folgenden Jahrzehnten wurden hieraus mehrere neue Verbindungen hergestellt, die sich in ihren Seitenketten unterscheiden. Das Wirkungsspektrum wurde so besonders in den gramnegativen Bereich erweitert und die β -Laktamasestabilität erhöht (BOYD et al., 1975; DAVIES et al., 1996;

DEMAIN und ELANDER, 1999; FRIEDRICH und MÜLLER-JAHNKE, 1996; NOSEK, 1997; ROLINSON, 1979+1998).

Die β -Laktamantibiotika verdanken ihren Namen der β -Laktam-Ringstruktur ihres molekularen Grundgerüsts (Abbildung 1). Diese findet sich in der 6-Aminopenicillansäure (6-APS) bei den Penicillinen und der 7-Amino-Cephalosporansäure (7-ACS) bei den Cephalosporinen, als auch in der Clavulansäure, den Cephamecinen, Oxacephemen, Carbapenemen und Monolactamen wieder. Während die Clavulansäure als β -Laktamaseinhibitor in Kombinationspräparaten Anwendung findet, spielen die letztgenannten Gruppen in der Veterinärmedizin keine Rolle. Cephalosporine werden heute teilsynthetisch hergestellt (FECKNER et al., 2000). Pilzkulturen wie Cephalosporium- oder Streptomycesarten produzieren die Grundstruktur, eine 7-Aminocephalosporansäure, aus dem Penicillingerüst mit Hilfe des bifunktionellen Enzyms Expandase/Hydroxylase. Dieses Enzym wird nicht nur von Hyphenpilzen, sondern auch von Bakterien synthetisiert. Bei diesen sind die Expandase und die Hydroxylase zwei eigenständige Enzyme (KUHN et al., 1999; NOSEK, 1997). Während Benzylpenicillin lipophil ist, ist Cephalosporin C hydrophil und daher aufwendiger in der Extraktion aus dem Kulturmedium.

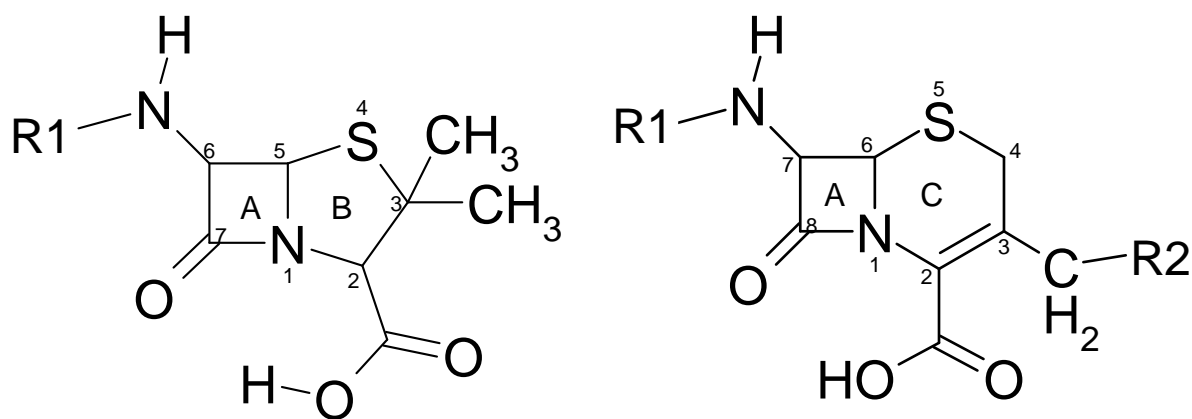
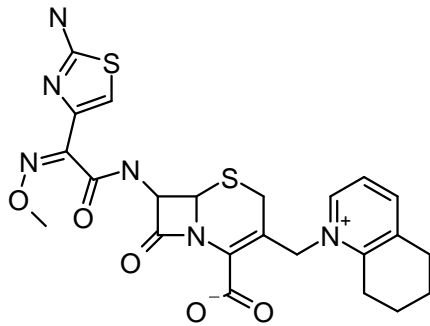
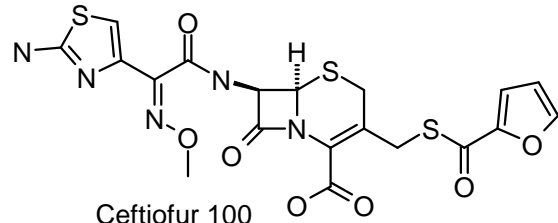


Abbildung 1: Vergleich der chemischen Grundstruktur (IUPAC-Nomenklatur) der Penicilline („Penam-Grundkörper“ der 6-Aminopenicillinsäure, links) und der Cephalosporine („3-Cephem-Grundkörper“ der 7-Aminocephalosporansäure, rechts). Beide weisen einen β -Laktamring (A) auf, der bei den Penicillinen mit einem 5-gliedrigen Thiazolidonring (B) und bei den Cephalosporinen mit einem 6-gliedrigen Dihydrothiazinring (C) verknüpft ist. Penicilline sind (mit Ausnahme der Langzeitpenicilline) meist nur an der 6-Aminogruppe (R1) substituiert, während Cephalosporine üblicherweise Substituenten an der 7-Aminogruppe (R1) sowie an der 3-Methylgruppe (R2) aufweisen.

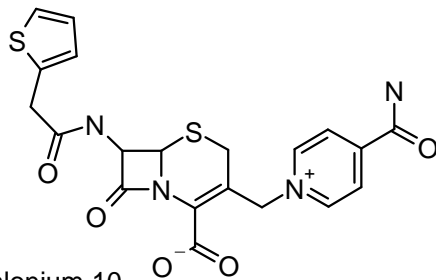
Entsprechend des Zeitraumes ihrer Entwicklung wird häufig eine Einteilung der Cephalosporine in vier „Generationen“ vorgenommen, die in der Veterinärmedizin noch weithin gebräuchlich ist (Abbildung 2). Unter den in der Tiermedizin eingesetzten Cephalosporinen herrschen überwiegend Vertreter der ersten Generation (z.B. Cefalexin, Cefacetril, Cefalonium, Cefapirin) vor. Cefquinom, Cefoperazon und Ceftiofur gehören zu den sogenannten neueren Cephalosporinen der dritten Generation (EMEA, 1995), Cefquinom wird nach anderer Interpretation zur vierten Generation gerechnet (Intervet, 2004a). Unter diesen Wirkstoffen wird Cefquinom ausschließlich in der Veterinärmedizin eingesetzt. Die praktische Relevanz dieser Einteilung ist jedoch umstritten (SCHOLZ, 2001; SCHOLZ et al., 2000; SHAH, 2001). Neben der Einteilung nach Generationen können die Cephalosporine auch nach ihren Wirkungseigenschaften bzw. ihrem Wirkungsspektrum, chemischen Strukturmerkmalen oder Applikationsarten eingeteilt werden (GRÄFE, 1992).



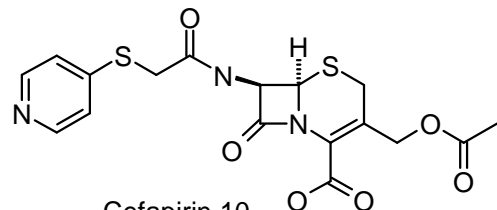
Cefquinom 20



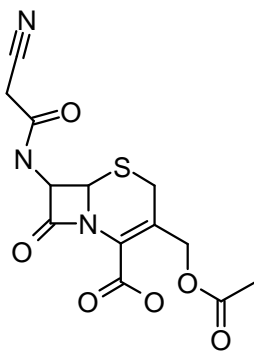
Ceftiofur 100



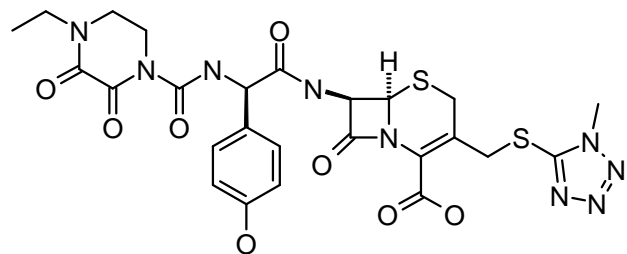
Cefalonium 10



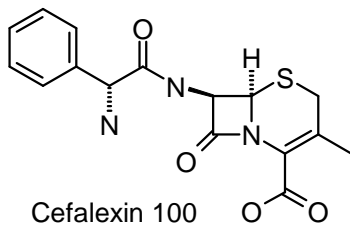
Cefapirin 10



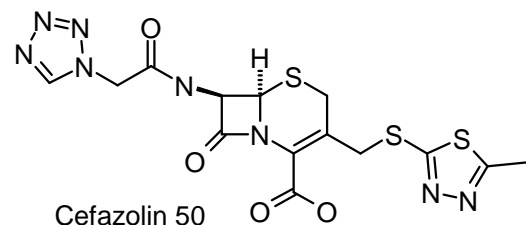
Cefacetril 125



Cefoperazon 50



Cefalexin 100



Cefazolin 50

Abbildung 2: Vergleich der Strukturformeln von Cephalosporin-Antibiotika, die für einen Einsatz bei laktierenden Kühen zugelassen sind. Neben dem Substanznamen ist jeweils der MRL-Wert für Milch ($\mu\text{g/kg}$) angegeben.

Der Wirkort der β -Laktamantibiotika liegt in der bakteriellen Zellmembran. Die Bakterienhülle besteht bei grampositiven Bakterien zu etwa 50% aus Murein, bei gramnegativen Bakterien macht dieses Peptidoglykan nur 5-10% der Zellwand aus. Murein besteht aus Ketten von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, die über Oligopeptidketten durch membranständige Transpeptidasen quervernetzt werden. Bakterielle Transpeptidasen haben eine hohe Affinität für β -Laktame und werden daher als penicillinbindende Proteine (PBPs) bezeichnet (LESSEL, 1996). Der β -Laktamring spaltet sich nach dem Andocken auf und bindet durch seine D-Alanyl-D-Alanin-Konfiguration kovalent an das aktive Zentrum der bakteriellen D-Alanin-Transpeptidase (BOYD, 1983). β -Laktame wirken so peptidmimetisch und inhibitorisch. Die Zellwand hält dem steigenden Innendruck in der Bakterienzelle bei deren Wachstum nicht mehr stand und es kommt zur Lysis. Somit bieten nur proliferierende Zellen mit Zellwand einen Angriffspunkt, weshalb diese bakterizid wirkenden Antibiotika nicht mit bakteriostatisch wirkenden kombiniert werden sollten. Die Zellwände der tierischen Zellen besitzen kein Murein und sind daher unempfindlich gegenüber dem β -Laktamring. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Zellwand bei grampositiven und gramnegativen Keimen macht auch klar, warum die klassischen Penicilline besonders im grampositiven Spektrum wirken. Allerdings besitzen manche Bakterien bestimmte Resistenzfaktoren, sie können z.B. β -Laktamasen produzieren. Diese spalten das Ringsystem hydrolytisch und machen das Antibiotikum so unwirksam. (GEISEL und SCHMITZ, 2000; KROKER et al., 1996; MASON und KIETZMANN, 1999). Gegen diesen Effekt werden besonders bei den medikamentellen Formulierungen von Penicillinen β -Laktamase-Inhibitoren (z.B. Clavulansäure) zugesetzt. Diese haben zwar keinen direkten antibiotischen Effekt, besitzen jedoch die Fähigkeit bestimmte β -Laktamasen zu blockieren (STAHLMANN und LODE, 2001).

2.3.2 *Gesundheitliche und technologische Risiken durch Rückstände von β -Laktamantibiotika in Lebensmitteln tierischen Ursprungs*

2.3.2.1 Gesundheitliche Risiken für den Verbraucher

Rückstände antimikrobiell wirksamer Tierarzneimittel in Lebensmitteln stellen unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten ein Risiko dar. Zum einen sind pharmakologisch wirksame Stoffe bei Aufnahme über die Nahrung generell ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher. Während die akute Toxizität von Antibiotika in diesem Zusammenhang keine Rolle spielt, sind immunologische Reaktionen und bakterielle Resistenzbildung nicht zu vernachlässigen.

Insbesondere bei den β -Laktamantibiotika besteht ein grundsätzliches Risiko einer Auslösung von Allergien bzw. von allergischen Reaktionen bei bereits Penicillin-überempfindlichen Personen nach oraler Aufnahme auch kleinerer Wirkstoffmengen. Ursache hierfür ist die Eigenschaft von β -Laktamantibiotika, unter Spaltung des β -Laktamrings kovalente Bindungen mit Proteinen (z.B. mit Serumproteinen, aber auch Molkenproteinen), einzugehen, wodurch antigene bzw. allergene Eigenschaften generiert werden (BECKER, 1976; DEWDNEY und EDWARDS, 1984; DEWDNEY et al., 1991; RUSSEL und LESSOF, 1971).

IgE-Antikörper gegen Penicilline bzw. Cephalosporine sind häufig gegen den β -Laktam-Nucleus in geöffneter und an Protein konjugierter Form (z.B. Benzylpenicilloyl-Konjugate, BPO) gerichtet. Dieser fungiert als so genannte „major determinant“ (DEWDNEY und EDWARDS, 1984), Kreuzallergien sind in diesem Falle wahrscheinlich, da der β -Laktamring in allen Penicillin- und Cephalosporinderivaten vorkommt. Benzylpenicilloylkonjugate sind somit auch ein wichtiges Werkzeug bei der Diagnostik einer β -Laktam-Allergie bzw. dem Nachweis von IgE-Antikörpern, beispielsweise mittels Radioallergosorbent Test (RAST). Weitere Reaktions- bzw. Umlagerungsreaktionen der konjugierten Penicilloyl-Metaboliten können dann sogenannte „minor determinants“ generieren. Antikörper können sich aber auch spezifisch gegen Seitenkettenreste oder Kombinationen aus Grundgerüst und Seitenkette richten, wobei ein hoher Substitutionsgrad die Komplexität der Immunreaktionen erhöht (ADKINSON, 1990; AUDICANA et al., 1994; BALDO et al., 2001; BERZOFISKY und SCHECHTER, 1981; BLANCA et al., 2002; BUNDGAARD, 1976; DE HAAN et al., 1976; DEWDNEY et al.,

1991; GOMEZ et al., 2004; HAMILTON-MILLER, 1976; HOU und POOLE, 1971; MUTSCHLER, 1996; PHAM und BALDO, 1996; SIMON und STILLE, 1993). Die präzise in-vitro Diagnostik der β -Laktamantibiotika-Allergie wird durch diese komplexen immunologischen Reaktionen erschwert (BLANCA et al., 1989; BLANCA et al., 2002; KELKAR und LI, 2001; ROMANO et al., 2004; ZHAO et al., 2002; VEGA et al., 1991).

Allergische Reaktionen bei Patienten sind nach therapeutischer Anwendung von Cephalosporinen mindestens so häufig zu beobachten wie bei strukturverschiedenen Penicillinderivaten und sind vor allem auf ähnliche Seitenketten zurückzuführen (BALDO, 1999; BALDO et al., 2001; KELKAR und LI, 2001). Der Anteil der Patienten, die sowohl auf Penicilline, als auch auf Cephalosporine reagieren, hängt von der Strukturähnlichkeit der jeweiligen Substanzen ab, wird aber auf nicht mehr als 16% aller Patienten mit β -Laktamallergie geschätzt (HARLE und BALDO, 1990; NOVALBOS et al., 2001; VOGEL et al., 2004).

Insbesondere zur Induktion von Allergien dürften jedoch in der Regel - aus rückstandsanalytischer Sicht – immer noch relativ hohe Rückstandskonzentrationen erforderlich sein. Während in den Anfängen der Antibiotikatherapie bei Milchkühen sehr hohe Rückstandskonzentrationen in Konsummilch im mg/kg-Bereich nicht unüblich waren und demzufolge auch das Allergierisiko nicht vernachlässigbar war (FLOß, 1997), wurden derartige Fälle in den letzten Jahrzehnten nicht mehr berichtet. Für β -Laktamantibiotika wird daher das Allergierisiko durch Milchkonsum seit langem als vergleichsweise gering eingestuft, vor allem da die Antigen-Dichte selbst in positiven Milchproben sehr niedrig ist (DEWDNEY und EDWARDS, 1984; DEWDNEY et al., 1991; MOL, 1975; TERPLAN und ZAADHOF, 1975; TEUFEL, 2003; TROLLDENIER und ESCHER, 1978).

In der Praxis bedeutsamer dürfte dagegen die Möglichkeit einer Resistenzbildung von Mikroorganismen durch subtherapeutische orale Dosen von Antibiotika sein, obwohl hier keine Daten zur praktischen Relevanz von Rückständen in Milch und anderen Lebensmitteln tierischen Ursprungs verfügbar sind. Im Hinblick auf Rückstände von Antiinfektiva in Lebensmitteln sind die Verbreitung bakterieller Resistenzen bzw. mögliche Wirkungen auf die menschliche Darmflora allerdings wesentliche Aspekte der Diskussion (BLANCA et al., 2003; BRACHT, 2004; BRADY et al., 1993; DEBACKERE, 1995; MARTH und ELLICKSON, 1959; MITCHELL und YEE, 1995; WALSER, 1979).

Inhibitorische Effekte niedriger Wirkstoffkonzentrationen auf die menschliche Darmflora sind zudem auch ein wichtiges Kriterium bei der Festsetzung von Höchstmengen nach EU-Verordnung 2377/90 im Rahmen des Zulassungsverfahrens durch die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA). Dieses Kriterium wurde beispielsweise auch für die Abschätzung des „acceptable daily intake (ADI)“-Wertes von Cefquinom (3,8 µg/kg Körpergewicht) berücksichtigt (EMA, 1995).

2.3.2.2 Technologische Risiken

Neben dem Gesichtspunkt des gesundheitlichen Verbraucherschutzes sind durch Hemmstoffe verursachte technologische Störungen ein wichtiger Faktor, der insbesondere bei der Herstellung fermentierter Milcherzeugnisse eine bedeutende wirtschaftliche Rolle spielt. Die bei der Verarbeitung von Milch zu Sauermilcherzeugnissen oder zu Käse zum Einsatz kommenden Bakterienkulturen (z.B. Milchsäurebakterien) sind teilweise sehr empfindlich gegenüber einigen häufig bei Milchkühen eingesetzten Antibiotika, insbesondere gegenüber β -Laktamantibiotika. Beispielsweise wird *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, eine wichtige Joghurtkultur, durch Penicillin G bereits in einem Konzentrationsbereich von 4-10 µg/kg gehemmt. Durch die hemmende Wirkung auf diese Bakterienkulturen, was im Bereich der Molkerei letztlich begriffsprägend zu dem Ausdruck „Hemmstoff“ führte, können durch Rückstände sehr große Milchmengen unbrauchbar werden (MARTH und ELLICKSON, 1959; SUHREN, 1996; TERPLAN und ZAADHOF, 1967).

In Tabelle 2 sind beispielhaft die minimalen Hemmkonzentrationen (technologische Störgrenze) einiger Starterkulturen gegenüber Penicillin G aufgelistet. So können beispielsweise 100.000 I.E. Penicillin G (1 I.E. Penicillin G entspricht ca. 600 ng), die von einem einzigen behandelten Tier ausgeschieden werden, ca. 10.000 kg Milch für die Weiterverarbeitung zu Joghurt und Käse unbrauchbar machen (BEYER, 1986; TROLLDENIER und ESCHER, 1978). Nach Berechnungen von SCHÄLLIBAUM (1986a) können durch ein einziges hemmstoffbelastetes Abendgemelk bis zu 150.000 kg Milch unbrauchbar gemacht werden. Für Cefquinom errechneten KNAPPSTEIN et al. (2004), dass 1 Liter einer behandelten Kuh im Extremfall 1000 l Anlieferungsmilch als Lebensmittel unbrauchbar machen können.

Tabelle 2: Empfindlichkeit einiger Starterkulturen gegenüber Penicillin G (modifiziert nach: MARTH, 1966; MARTH und ELLICKSON, 1959; SUHREN, 1996; TERPLAN und ZAADHOF, 1967)

Kultur	Minimale Konzentration von Penicillin G, bei der Veränderungen im Stoffwechsel der Kulturen beobachtet wurde	
	I.E./ml	µg/kg
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	0,0017-0,17	1-21
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	0,3-0,6	9-19
„Säurewecker“ Käse	0,05-0,2	100
Emmentaler-Mischkultur	-	0,6
„Butter“-Säurewecker	0,017-0,17	
Joghurt-Mischkultur	-	1,6-5 (63)
Joghurtkultur Visbyvac 709 (Labor Wiesby, Niebüll)	-	<4
Joghurtkultur Visbyvac V2 (Labor Wiesby, Niebüll)	-	<4
Mesophile homofermentative Kultur R-607 (Chr. Hansen, Lübeck)	-	<4

Für Cefquinom existieren nur vergleichsweise wenige Daten zur Hemmwirkung auf molkereitechnologisch relevante Starterkulturen. Allerdings wurde im Rahmen des MRL-Verfahrens (EMEA, 1995) *Streptococcus thermophilus* (gemeint ist wahrscheinlich *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*) als empfindlichste Spezies angeführt (Nicht mehr hemmend wirksame Konzentration: 20 ng/ml). Der technologische Effekt von Cefquinom ist wesentlich stärker ausgeprägt als die Effekte auf die menschliche Darmflora, weshalb der MRL letztlich auf der technologischen Störkonzentration basiert.

2.3.3 *Eigenschaften und therapeutische Anwendung von Cefquinom*

2.3.3.1 Chemisch-physikalische Eigenschaften

Cefquinom ist eine wenig fettlösliche organische Säure mit einem pK_a -Wert von 2,51 und 2,91 (EMA/MRL/005/95). Die Herstellung erfolgt halbsynthetisch aus der Grundsubstanz Cefotaximsäure. Das Molekulargewicht liegt bei 528,5998, die Summenformel lautet $C_{23}H_{24}N_6O_5S_2$ und der vollständige Name lautet 1-[[[(6R, 7R)-7-[[[(2Z)-(2-amino-4-thiazolyl)(methoxyimino)acetyl]amino]-2-carboxy-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-3-yl]methyl]-5,6,7,8-tetrahydrochinolinium. Die Strukturformel ist in Abbildung 3 dargestellt. Cefquinom besitzt ausgeprägte UV-Absorptionseigenschaften mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 265 nm. Es unterscheidet sich von den Aminothiazol-Cephalosporinen, der 3. Generation der Cephalosporine (BÖTTNER et al., 1995), durch eine quaternäre Ammoniumgruppe und die daraus resultierende Zwitterionenstruktur.

Weiterhin besitzt Cefquinom eine Amino-thiazolyl-Methoxyimino-Acetamidogruppe an Position 7 des 3-Cephemkerns. Dies erhöht seine Aktivität gegen gramnegative Bakterien durch eine erhöhte β -Laktamasestabilität. Cefquinom bindet an die zellwandständigen PBPs 3 und 1 A/B und wird in geringem Maße von den β -Laktamasen TEM 3, 5 und 9 hydrolysiert (CHIN et al., 1992; LIMBERT et al., 1991). Im medizinischen Präparaten (Cobactan[®]) liegt es als Sulfat in einer Suspension oder als Pulver zur Rekonstitution einer Injektionslösung vor (INTERVET, 2002a; INTERVET, 2005). Die in Euterinjektoren verwendete Suspension scheint nach Angaben von KNAPPSTEIN et al. (2005) bei erhöhten Temperaturen über 30 °C zu Viskositätsveränderungen bzw. Klumpenbildung zu neigen, so dass bei der Lagerung entsprechender Präparate Vorsicht angezeigt ist.

2.3.3.2 Therapeutischer Einsatz von Cefquinom in der Veterinärmedizin

Cefquinom findet in der Tiermedizin unter dem Namen Cobactan[®] als Injektionslösung oder Euterinjektor Anwendung. Es ist das erste ausschließlich in der Veterinärmedizin zugelassene Cephalosporin der vierten Generation (BÖTTNER et al., 1995; EMA, 2003a; ERRECALDE et al., 2002; GUÉRIN-FAUBLÉE et al., 2003; ROSE et al. 1996; SCHMID und THOMAS, 2002; SHIPGEL und SCHMID, 1997). Andere Quellen ordnen Cefquinom

allerdings noch der dritten Generation zu (EMEA/MRL/005/95; EMEA/MRL/405/98; EMEA/MRL/454/99; MASON und KIETZMANN, 1999; SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA, 2001). Cefquinom zeichnet sich durch eine relativ hohe β -Laktamasestabilität und ein breites Wirkungsspektrum sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien aus.

Cefquinom ist für das Rind als Cobactan[®] 2,5% (ad inj.) zugelassen zur Behandlung von bakteriellen Infektionen der Lunge und der Atemwege. Weitere Indikationen sind Klauenerkrankungen (Dermatitis digitalis, Ballenfäule, Panaritium), Mastitiden und *Escherichia (E.) coli*-Septikämie des Kalbes (KLUGE und UNGEMACH, 1998). Der Euterinjektor Cobactan[®] LC ist zur Behandlung subklinischer und klinischer Mastitiden (hervorgerufen beispielsweise durch *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus* und *E. coli*) zugelassen. Als Euterinjektor Cobactan[®] DC kann Cefquinom zur Behandlung subklinischer Mastitiden durch Streptokokken- und Staphylokokkenspezies während der Trockenstehperiode eingesetzt werden. Weitere Untersuchungen zur Wirksamkeit bei der Behandlung von Endometritiden beim Rind (AMIRIDIS et al., 2003; SHELDON et al., 2004) und der *E. coli*-Diarrhoe beim Kalb (ORDEN et al., 1999) liegen vor.

Beim Schwein wird Cobactan[®] 2,5% (ad inj.) zur Therapie von Lungen- bzw. Atemwegsinfekten und beim Metritis-Mastitis-Agalaktie-Syndrom eingesetzt. Für Ferkel umfassen die Indikationen Meningitis, Arthritis und Epidermitis (INTERVET, 2002a+b).

Beim Pferd wird Cobactan[®] IV 4,5% (ad inj.) zur Therapie bakterieller Erkrankungen des Atmungstraktes und bei der Septikämie des Fohlens eingesetzt (EMEA, 2003a). Darüberhinaus wurden Studien zum Einsatz von Cefquinom bei der antimikrobiellen Therapie von Kleintieren publiziert (GANIERE et al., 2005; LOHR et al., 2004).

Die Dosierung für die Injektionslösung (intramuskulär oder subcutan) liegt bei der erwachsenen Kuh bei 1 mg/kg KGW, beim Kalb und beim Schwein bei 2 mg/kg KGW, jeweils einmal täglich. Beim Pferd liegt die Dosis ebenfalls bei 1 mg/kg KGW pro Tag, beim Fohlen wird eine zweimal tägliche Anwendung empfohlen. Je nach Art der Erkrankung wird das Antibiotikum an zwei bis fünf aufeinander folgenden Tagen i.m. oder s.c. gegeben (EMEA, 2003a; HEINRITZI und HAGN, 1999; WINTER et al., 2003). Die

Wirkstoffmenge der Euterinjektoren liegt nach Herstellerangaben bei 75 mg Cefquinom (Cobactan[®] LC, acht Gramm Injektorgesamtmenge) bzw. bei 150 mg Cefquinom (Cobactan[®] DC, drei Gramm Injektorgesamtmenge).

Die Wartezeit liegt für Cobactan 2,5% (Wirkstoff: Cefquinom) ad inj. bei einem Tag für Milch, für essbare Gewebe beim Rind bei fünf Tagen. Beim Schwein gilt eine Wartezeit von drei Tagen. Für den Euterinjektor Cobactan[®] LC gilt eine Wartezeit von fünf Tagen für Milch, für essbares Gewebe eine Wartezeit von vier Tagen (INTERVET, 2004b). Für den 2005 neu auf den Markt gekommenen Euterinjektor Cobactan[®] DC zum Trockenstellen von Milchkühen gilt eine Wartezeit von zwei Tagen für essbares Gewebe. Für Milch liegt sie bei 49 Tagen bei einer Trockenstehperiode von weniger als sieben Wochen bzw. einem Tag bei einer Trockenstehperiode von mehr als sieben Wochen.

Die allgemeine Resistenzsituation und –entwicklung gegenüber Cefquinom wird beim Rind überwiegend als günstig bewertet, was auch damit zusammenhängen kann, dass entsprechende Präparate erst seit relativ kurzer Zeit eingesetzt werden (CORTI et al., 2003; TROLLDENIER, 1999). Die hohe Wirksamkeit schließt wichtige Mastitiserreger, aber auch beispielsweise Pasteurellen ein. Laut Herstellerangaben (INTERVET, 2004a) sind gegen Cefquinom resistente Bakterienstämme pathogener Spezies im Bereich der Mastitis und der Atemwegserkrankungen beim Rind noch nicht beschrieben worden. Seit Markteinführung des Medikaments 1994 hat sich nach SCHMID und THOMAS (2002) an der Resistenzlage kaum etwas geändert.

BÖTTNER et al. (1995) untersuchten von 1990 bis 1993 714 bakterielle Isolate (darunter 466 *Pasteurella* spp.) von Erregern klinischer Erkrankungen bei Rindern in Deutschland, Frankreich, Belgien, den Niederlanden und Großbritannien auf Resistenzen gegen zehn verschiedene Antibiotika, darunter Cefquinom. Als resistent wurden Keime eingestuft, deren minimale Hemmkonzentration über 2 µg/ml Cefquinom lag, die also jenseits der erreichbaren Wirkspiegel *in vivo* noch wachsen können. Vier Isolate aus der Gattung *Pasteurella* wurden als resistent gegen Cefquinom beurteilt.

ROSE et al. (1996) untersuchten 1994 bis 1996 Isolate von Pasteurellen aus dem Bronchialsekret von Rindern und fanden bis 0,9 % Cefquinom-resistente Stämme. In einer Studie von GUÉRIN-FAUBLÉE et al. (2003) wurden 495 Isolate wichtiger Mastitiserreger

untersucht. Dabei wiesen 4 von 122 untersuchten *E. coli*-Stämmen MICs von über 2 µg/ml Cefquinom auf. Alle 12 untersuchten Isolate von *Pseudomonas aeruginosa* waren Cefquinom-resistent. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen SHIPGEL und SCHMID (1997) bei einer Überprüfung der Empfindlichkeit von Mastitiserregern gegen Cefquinom. Cefquinom erwies sich nach Angaben dieser Autoren - mit Ausnahme von *Enterococcus* spp. und *Pseudomonas* spp. - als gut antibiotisch wirksam. Verschiedene neuere Untersuchungen aus dem deutschsprachigen Raum zeigten im Hinblick insbesondere auf die Wirksamkeit von Cefquinom auf bovine Mastitiserreger ein ähnlich positives Bild (CORTI et al., 2003; HÖBARTH et al., 2004; SCHRÖDER et al., 2005).

2.3.3.3 Pharmakologische Eigenschaften von Cefquinom, Bewertung durch die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA) sowie Rückstandsbildung in Milch

Cefquinom wird oral oder nach intramammärer Applikation kaum resorbiert. Nach intramuskulärer oder subkutaner Injektion erreicht es bereits nach 1,5-2 h maximale Serumkonzentrationen, die Halbwertszeit liegt bei 1-3 h. Cefquinom bindet zu 5-15% an Plasmaproteine (EMA, 1995; ROSE et al., 1996). Die höchsten Cefquinom-Gewebkonzentrationen finden sich - neben der Injektionsstelle - im Bronchialsekret, in der Niere und in der Leber. Nach parenteraler Applikation wird Cefquinom über glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion vorwiegend renal ausgeschieden. Der Wirkstoff kann, abhängig von der Tierart, nach 24 h zu 63 - 95% unverändert im Harn nachgewiesen werden (EMA, 1995; HEINRITZI und HAGN, 1999; LIMBERT et al., 1991). Unerwünschte Nebenwirkungen einer Applikation von Cefquinom sind nach Herstellerangaben, außer einer vorübergehenden Schwellung an der Injektionsstelle, keine bekannt (INTERVET, 2004a).

Eine zusammenfassende Bewertung von Cefquinom durch die EMA im Rahmen des MRL-Verfahrens, als Voraussetzung für die Zulassung bei lebensmittelliefernden Tieren, ist für die Spezies Rind, Schwein und Pferd unter <http://www.ema.eu.int/index/indexv1.htm> verfügbar. Die toxikologische Bewertung zeigte, dass aufgrund der sehr niedrigen Toxizität (Spezies: Hund) Konzentrationen erst ab oralen Dosen von 250 mg Cefquinom je kg Körpergewicht negative Effekte (hämolytische

Anämie) zu beobachten sind. Hinweise auf Teratogenität, Mutagenität oder Immuntoxizität wurden im Tierversuch bzw. in Zellkulturtests nicht festgestellt, zudem lagen keine Anhaltspunkte für eine mögliche Karzinogenität vor.

Bei der Untersuchung antimikrobieller Effekte auf die menschliche Darmflora wurde nach Überprüfung von 68 relevanten Bakterienstämmen (darunter z.B. Bifidobakterien, *Bacteroides* spp., *Proteus* spp.; Keimzahl jeweils $1,5 \times 10^9$ KBE/ml) eine antimikrobiell unwirksame Dosis (NOEL) von $1,5 \mu\text{g/ml}$ abgeleitet. Hieraus wurde eine tolerierbare Tagesaufnahme an Cefquinom für den Menschen (60 kg Körpergewicht) von $3,8 \mu\text{g/kg}$ Körpergewicht errechnet, unter Annahme einer 10%igen bakteriellen Verfügbarkeit oralen Cefquinoms und unter Verwendung eines Sicherheitsfaktors von 10. Bei einem üblicherweise angenommenen täglichen Milchverzehr von 1 kg würde dies (bei alleiniger Berücksichtigung von Milch als Aufnahmequelle) Höchstmengen für Cefquinom von rund $200 \mu\text{g/kg}$ erlauben.

Die Überprüfung der Wirkung von Cefquinom auf verschiedene in der Milchverarbeitung eingesetzte Starterkulturen zeigte, dass *Streptococcus* [wahrscheinlich: *salivarius* ssp.] *thermophilus*, eine essentielle Joghurtkultur, mit einer antimikrobiell unwirksamen Dosis (NOEL) von 20 ng/ml die empfindlichste Spezies darstellte. Der MRL für Cefquinom in Milch von $20 \mu\text{g/kg}$ wurde daher letztlich aufgrund der milchtechnologisch relevanten Störwirkung auf *Streptococcus thermophilus* festgesetzt.

Untersuchungen zur Ausscheidung von Cefquinom nach fünfmaliger intramuskulärer Applikation von 1 mg (radioaktiv markiertem) Cefquinom je kg Körpergewicht ergaben niedrige Rückstandskonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze (ca. $0,01\text{-}0,05 \mu\text{g/kg}$) innerhalb von 12 h nach der letzten Applikation. Nach intramammärer Applikation von Cefquinom bei laktierenden Kühen lagen die Rückstandskonzentrationen in Milch nach 10 Gemelken unterhalb eines Wertes $20 \mu\text{g/l}$.

Untersuchungen von KNAPPSTEIN et al. (2003b) bzw. KNAPPSTEIN et al. (2005) bestätigen diese Angaben des EMEA-Bewertungsberichts grundsätzlich, allerdings nur im Hinblick auf einen sachgemäßen Umgang mit dem Präparat. Diese Autoren applizierten fünf gesunden Kühen Cobactan LC jeweils 3 x intramammär innerhalb von 24 h in alle vier Viertel (75 mg Cefquinom je Applikation). Unmittelbar nach Applikation wurden

Cefquinom-Rückstände in Milch in einem Konzentrationsbereich von rund 10 mg/kg festgestellt. Nach Ablauf der Wartezeit (120 h bzw. 5 Tage) wurde bei allen regulär behandelten Tieren eine Rückstandskonzentration im Gesamtmelk von 20 µg/l unterschritten.

Nach unabsichtlicher unsachgemäßer Lagerung der Euterinjektoren bei Temperaturen von über 30 °C wurden jedoch bei fünf von sechs Tieren auch nach 5 Tagen noch Rückstandskonzentrationen in Milch von über 20 µg/kg gemessen, teilweise wurde der MRL erst nach 10 Tagen unterschritten. Unsachgemäß gelagerte Trockensteller wiesen eine veränderte Viskosität der Emulsion (bei unveränderter Wirkstoffkonzentration) auf, was von KNAPPSTEIN et al. (2005) als wahrscheinliche Ursache für die festgestellte verlängerte Ausscheidung angeführt wurde. Diese Befunde werfen die Frage auf, inwieweit unsachgemäße Lagerung auch in der landwirtschaftlichen Praxis zu einer verlängerten Ausscheidung führen könnte, insbesondere in den Sommermonaten. Eine Erhöhung der Dosis oder der Applikationsfrequenz über die Herstellerempfehlung hinaus könnte aufgrund der Ergebnisse von KNAPPSTEIN et al. (2005) ebenfalls zu erhöhten Cefquinom-Rückstandskonzentrationen führen.

BERRUGA et al. (2004) untersuchten die Ausscheidung von Cefquinom in die Milch laktierender Schafe nach intramuskulärer Applikation und konnten zu keinem Zeitpunkt Rückstände in Milch nachweisen. Allerdings weisen die von diesen Autoren verwendeten Nachweisverfahren (AIM BRT MRL Test, Penzym 100 Test) nur eine unzureichende Nachweisgrenze für Cefquinom von >100 µg/kg auf (siehe Kapitel 2.4). Die Ergebnisse sind daher vorsichtig zu interpretieren.

Zur Vorkommenshäufigkeit von Cefquinom-Rückständen in Anlieferungsmilch oder in Konsummilch liegen keine publizierten Untersuchungen vor. Hierbei ist ebenfalls zu berücksichtigen, dass in einem „Konzentrationsfensters“ zwischen dem MRL (20 µg/kg) und der Nachweisgrenze der am meisten verwendeten Routinetests (100 µg/kg) derzeit analytische Defizite bestehen.

2.4 Nachweisverfahren für Cefquinom in Milch

Als Konsequenz der Festsetzung von MRL-Werten nach Verordnung (EWG) 2377/90 wurde die Analytik von Arzneimittelrückständen in den letzten 10 Jahren stark weiterentwickelt und verbessert. Die Nachweisprinzipien der in der Milchanalytik verwendeten Verfahren sind mikrobiologischer, biochemischer, physikalisch-chemischer oder immunologischer Natur. Sie unterscheiden sich stark in der Sensitivität, Testdauer und Wirtschaftlichkeit. Da es nicht möglich ist, alle mit MRL belegten β -Laktamantibiotika sowie die anderen relevanten Wirkstoffe gleichzeitig und mit ausreichender Empfindlichkeit nachzuweisen, wurden verschiedene „integrierte Nachweissysteme“ entwickelt (HEESCHEN und SUHREN, 1996; HOLTKÖTTER et al. 2002; SUHREN, 2002; TEUFEL, 1998). Durch Kombination bzw. Hintereinanderschaltung verschiedener Testsysteme mit unterschiedlichem Nachweisspektrum wird so auf wirtschaftliche und schnelle Art der Nachweis der meisten β -Laktame auf MRL-Niveau möglich. Dieses Untersuchungskonzept wurde auch der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB aufgenommen. Im Folgenden werden Testverfahren beschrieben, mit denen Cefquinom nachgewiesen werden kann.

2.4.1 Mikrobiologische Nachweisverfahren

Mikrobiologische Testsysteme beruhen auf dem Prinzip der Hemmung von Wachstum und Stoffwechsel bestimmter bakterieller Testkeime durch in Proben befindliche Hemmstoffe. Bei der Untersuchung von Milchproben wird aufgrund seiner Praktikabilität und seiner hohen Empfindlichkeit für Penicillin G fast ausschließlich *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*¹ als Testkeim eingesetzt (GILBERTSON et al., 1995; ZAADHOF et al., 1997). Als weitere Testkeime, zumeist beschränkt auf spezifische Fragestellungen, wurden auch *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* und *Streptococcus thermophilus* vorgeschlagen (GAUDIN et al., 2004; MITCHELL et al., 1998). Die Auswertung geschieht durch die Beurteilung des Hemmhofes (Blättchentest) oder des Farbumschlags eines dem Nährmedium zugesetzten

¹ Seit 2001 durch NAZINA et al. (2001) dem Genus *Geobacillus* zugeordnet.

Indikatoren (z.B. Redoxindikator Brillantschwarz, pH-Indikator Bromkresolpurpur): Durch Stoffwechselprodukte der wachsenden Bakterien kommt es zur pH-Verschiebung im Medium bzw. zu Reduktionsreaktionen (Brillantschwarz-Reduktionstests, BRT). Dies bewirkt einen Farbumschlag der zugesetzten Indikatoren, der durch vorhandene Hemmstoffe ganz oder teilweise verhindert wird.

Den im Rahmen der Milchgüteverordnung anfallenden sehr hohen Probenzahlen (ca. 10 Millionen pro Jahr) werden mikrobiologische Hemmstofftests im Sinne von Screeningverfahren am besten gerecht, daneben sind sie mit Kosten von weniger als 1 Euro je Probe sehr kostengünstig. Zudem liegen Ergebnisse typischerweise nach drei bis vier Stunden vor. Das Ergebnis der nach Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB geprüften mikrobiologischen Testverfahren für Hemmstoffe sind für die Beurteilung nach Milchgüteverordnung ausreichend, d.h. ein positives Ergebnis bedarf prinzipiell keiner weiteren Nachuntersuchung.

Durch Einsatz weiterer Reagenzien, beispielsweise durch Penicillinase, ist jedoch eine einfache Differenzierung der Wirkstoffe in Penicilline und nicht-Penicilline möglich, häufig werden daher in der Praxis Hemmstoff-positive Proben solcherart nachuntersucht. Weitere Modifikationen, beispielsweise der parallele Zusatz von Paraaminobenzoessäure zur Antagonisierung von Sulfonamiden können die mittels mikrobiologischer Testsysteme erhaltene Information zur Wirkstoffidentität etwas verbessern. Diese Tests werden zudem immer wieder evaluiert und weiterentwickelt (MÄRTLBAUER, 1995; NOUWS et al., 1999a+b; SCHLIEPHAKE, 1998; SUHREN und HEESCHEN, 1996; SUHREN und REICHMUTH, 1998a+b).

Kritisiert wird allerdings seit längerem, dass die gebräuchlichen mikrobiologischen Testverfahren nicht alle Wirkstoffe erfassen (z.B. Chloramphenicol erst ab >10 mg/l) oder nur in sehr hohen Konzentrationen weit über den MRL erfassen können (z.B. Aminoglykoside). Zudem sind Störungen durch Probenmatrixeffekte oder durch abweichende Milchezusammensetzung bzw. veränderte Gehalte der Milchinhaltsstoffe nicht ganz auszuschließen (ANDREW, 2000; ANDREW et al., 1997; CULLOR, 1993; HILLERTON et al., 1999; SUHREN und HEESCHEN, 1990; VAN EENENNAAM et al., 1993). Zudem ist prinzipiell bei unbekanntem Wirkstoff keine Quantifizierung des antimikrobiell wirksamen Agens möglich.

In der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach LFGB § 64 werden zwei Methoden zur Untersuchung von Sammelmilch auf Hemmstoffe (L 01.01-5, L 01.00-6), zwei Suchtests für Antiinfektiva in Milch (L. 01.00-11, L. 01.00-62) und ein Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in roher und wärmebehandelter Milch (L 01.00-51) beschrieben. Alle diese Tests gehören zu den Agardiffusionsverfahren. Hierbei werden Agarböden mit verschiedenen antibiotikaempfindlichen Keimen beimpft. Diese wiederum werden durch aufgebrachte hemmstoffhaltige Proben, die in den Agar diffundieren, in ihrem Wachstum gehemmt.

Bei Methode L 01.01-5, dem Brillantschwarzreduktionstest (BRT), reduziert der Testkeim *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* das im Agar enthaltene Brillantschwarz und bewirkt so einen Farbumschlag von violett nach gelb. In Anwesenheit von Hemmstoffen wird diese Farbentwicklung ganz oder teilweise unterdrückt. Der Test dauert bis zu 3 h, ist preiswert und ermöglicht die effektive Bearbeitung großer Probenzahlen.

Seit der Erstbeschreibung durch KRAACK und TOLLE (1967) wurde der BRT bezüglich Spektrum und Sensitivität weiterentwickelt (CARLSSON und BJÖRK, 1987; CARLSSON et al., 1992; ZAADHOF et al., 1997; ZOMER und LIEU, 1996). Testkits werden von verschiedenen Herstellern vertrieben (Chr. Hansen GmbH, Lübeck; AIM, München; DSM Food Specialities, Dortmund). Ihre Empfindlichkeit für Cefquinom ist in Tabelle 3 dargestellt. Der Suchtest nach Methode L 01.00-11 stellt eine Modifikation des oben beschriebenen BRT (L 01.01-5) dar. Der wichtigste Unterschied liegt in der Auswertung. Nur die komplette Reduktion des Farbstoffes mit eindeutigem Farbumschlag nach gelb wird als negatives Ergebnis bewertet. Alle anderen Farbstufen werden als positiv gewertet und sollen weiter identifiziert und quantifiziert werden. Ähnlich ist die Vorgehensweise nach Methode L 01.00-51 (EG).

Bei einer zweiten mikrobiologischen Methode (L 01.00-6; Blättchentest) werden Milchproben-getränkte Blättchen auf den beimpften Agar aufgebracht. Eventuell enthaltene Antibiotika diffundieren in den Agar und hemmen das Wachstum des Testkeims. Der Durchmesser des Hemmhofs hängt direkt von Art und Menge des Hemmstoffes ab.

Einige kommerzielle Tests verwenden pH-Indikatoren, wie z.B. der Test T101 der Firma Valio Ltd. (Helsinki, Finnland). Hier ist es der Keim *Streptococcus thermophilus*, der einen Farbumschlag von blau nach gelb verursacht. Das Ergebnis wird anhand der mitangesetzten Negativkontrolle und einer Farbtafel beurteilt. Die Empfindlichkeit dieses Tests für Cefquinom ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Der Delvotest[®] wird von DSM Food Science (Dortmund) in verschiedenen Versionen angeboten, die sich teilweise in ihrer Sensitivität unterscheiden (DSM FOOD SPECIALITIES, 1999). Dem nährstofffreien Agar werden Sporen des Testkeimes (*B. stearothermophilus* var. *calidolactis*) und als pH-Indikator Bromkresolpurpur zugemischt. Nährstoffe werden erst kurz vor dem Testeinsatz mit der jeweiligen Probe zugegeben. Diese Trennung von Keim und Nährstoff erhöht die Haltbarkeit des Tests. Durch das Wachstum und die Stoffwechselprodukte der Keime verschiebt sich der pH-Wert des Agars ins saure und es kommt zum Farbumschlag von violett nach hellgelb. Die Auswertung erfolgt gemäß Methode L 01.00-51. Die Empfindlichkeit des Tests Delvo SP für Cefquinom ist in Tabelle 3 dargestellt.

Der Copan Test P&S der Firma Chr. Hansen GmbH (Lübeck) weist große Ähnlichkeit mit dem Delvotest auf. *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* verursacht auch hier einen pH-abhängigen Farbumschlag. Er wird als Einzeltest oder in Form von Mikrotiterplatten angeboten. Die Nachweisgrenze für Cefquinom ist in Tabelle 3 angegeben.

Der Premi[®] Test basiert ebenfalls auf dem Prinzip der bakteriologischen Wachstumshemmung und ist ein Nachweissystem für Antibiotika in Fleisch und Fleischprodukten, in Niere, Fisch und Eiern (ARTS et al., 2005; STEAD et al., 2004). Er weist für Leber, Muskel und Niere eine Nachweisempfindlichkeit für Cefquinom von 100 µg/kg auf.

Ein Vergleich aller in Tabelle 3 zusammengestellten Nachweisgrenzen kommerzieller mikrobiologischer Testsysteme für Cefquinom in Milch zeigt, dass mit keinem Verfahren Rückstände auf dem MRL-Niveau von 20 µg/kg erfassbar sind. Im günstigsten Fall können mit diesen Verfahren Cefquinom-Konzentrationen von >40 µg/kg, meist jedoch erst ab 100 µg/kg, nachgewiesen werden. Zwar gelten die MRL-Anforderungen der Verordnung 2377/90 im engeren Sinne erst für Konsummilch bzw. Milcherzeugnisse. Dennoch ist dies

als praktisches Problem bei der Kontrolle von Anlieferungsmilch zu sehen, da Cefquinom in großem Umfang eingesetzt wird und Rückstände im Bereich des MRLs als Hemmstoffnegativ beurteilt werden. Dadurch sind die Ergebnisse der Hemmstoffkontrollen im Rahmen der Milchgüteverordnung nur eingeschränkt als Datenbasis für eine Abschätzung der tatsächlichen Vorkommenshäufigkeit von Cefquinom-Rückstandsbelasteter Anlieferungsmilch brauchbar.

2.4.2 *Rezeptorbindungstests*

Durch Isolierung und Reindarstellung von bakteriellen Penicillin-Bindungsproteinen konnten Testsysteme ähnlich den antikörperbasierten Immuntests erstellt werden. Aus diesem Grund ist die Spezifität dieser Rezeptorbindungstests auf die β -Laktamantibiotika beschränkt (SCHLÖSSER et al., 2000). Bei diesen kompetitiven Testsystemen binden Antibiotika spezifisch an (markierte) Rezeptorproteine. Diese können in Schnelltests entweder membranfixiert sein oder frei in einer mehr oder weniger flüssigen Matrix vorliegen. Die Rezeptorproteine sind an verschiedene Marker, wie z.B. Goldpartikel, Latex, oder Enzyme gekoppelt.

Durch Antibiotika in der Probenlösung werden die Rezeptoren blockiert und stehen für eine nachfolgende Farbreaktion nicht mehr zur Verfügung. Daher ergeben negative Proben ein maximales Messsignal, während positive Proben zu einer Reduzierung des Messsignals (Farbentwicklung) führen. Die Auswertung der Tests kann visuell und/oder instrumentell anhand verschiedener Referenzwerte erfolgen. Aufgrund des umgekehrten Dosis-Wirkungsprinzips ist bei Rezeptorbindungstests für Antibiotika jedoch stets ein Vergleich mit einer in den Test integrierten Kontrollreaktion erforderlich. Die Tests unterscheiden sich bezüglich Sensitivität und Spektrum nachweisbarer Antibiotika, sowie bezüglich des Zeitaufwands und der benötigten Zusatzausstattung.

Beim Testsystem „Charm ROSA“ (= Rapid One Step Assay) sind die goldmarkierten Rezeptorproteine auf einem Teststreifen adsorbiert. Nach Aufbringen der Milchprobe reagieren diese gegebenenfalls mit in der Probe enthaltenen Antibiotika, der Rezeptor wird blockiert und eine Bindung an die so genannte Testbande im weiteren Verlauf der durch Kapillarkräfte vermittelten Migration der Flüssigkeit unterbleibt. Die Färbung des

Teststreifens durch die Goldpartikel ist somit umgekehrt proportional zur Konzentration der in der Probe enthaltenen Antibiotika. Die Auswertung erfolgt visuell oder instrumentell gegen eine Referenzbande. Innerhalb der Gruppe der β -Laktame kann nicht weiter differenziert werden. Dieser Test wird in verschiedenen Versionen angeboten (Charm Sciences, Inc., USA), mit denen 5 (Charm SL BL) oder 6 (Charm SL 6) β -Laktamantibiotika nachgewiesen werden können (DOUGLAS et al., 2003). Die Nachweisgrenzen von Charm ROSA für Cefquinom sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Für den SNAP[®] Beta-laktam-Test (IDEXX GmbH, Wörrstadt). werden die Rezeptorproteine mit einem Enzym, der Meerrettichperoxidase, gekoppelt. Die Farbintensität des Probenfeldes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des in der Probe enthaltenen β -Laktamantibiotikums und kann visuell oder instrumentell ausgewertet werden (SUHREN und REICHMUTH, 1998a). Die Empfindlichkeit dieses Tests für Cefquinom ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Auch beim β s.t.a.r. handelt es sich um einen indirekten kompetitiven Rezeptorbindungstest (Chr. Hansen GmbH, Nienburg). Das Rezeptorprotein ist hier an Goldpartikel gebunden und wird mit der Probe zusammen vorinkubiert, wobei es an in der Probe enthaltenes β -Laktamantibiotikum spezifisch bindet. Danach wird ein Teststreifen in die Proben-Reagenzmischung eingetaucht. Dieser Teststreifen ist auf einer schmalen Bande mit β -Laktamantibiotika beschichtet. Die Rezeptoren, die im ersten Schritt noch nicht durch Antibiotika gebunden wurden, können hier ankoppeln. Durch die an die Rezeptoren gekoppelten Goldpartikel kommt es zu einer Rotverfärbung an dieser Stelle des Teststreifens. Die Intensität dieser Färbung ist umgekehrt proportional zur Konzentration an β -Laktamantibiotika in der Probe. Auch hier kann das Ergebnis gegen eine Referenzbande visuell oder instrumentell ausgewertet werden. Die Empfindlichkeit dieses Tests für Cefquinom ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Der Delvo-X-Press ist ein kompetitiver Enzym-Rezeptortest und ähnelt in der Durchführung einem Enzymimmunttest (DSM FOOD SPECIALITIES, 1999). Die Rezeptorproteine sind hier mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert und werden mit der Probe zusammen in Röhrchen inkubiert. Diese Röhrchen sind mit β -Laktamantibiotika beschichtet. In der Probe enthaltenes Antibiotikum konkurriert mit dem Beschichtungsantibiotikum um die Bindungsstellen an den Rezeptorproteinen. Nach einem

Waschschritt wird Enzymsubstrat-Chromogenlösung zur Farbentwicklung hinzugegeben. Je mehr Antibiotikum in der Probe war, umso geringer fällt die Farbentwicklung aus. Ihre Absorption wird anschließend in einem Photometer bei 660 nm gemessen. Dieses wiederum ist in eine „Workstation“ integriert, in der der ganze Testablauf stattfindet. Die Nachweisempfindlichkeit für Cefquinom ist in Tabelle 3 angegeben.

Ähnlich wie ein Radioimmuntest arbeitet der Charm II Betalactam Test. Hier werden β -Laktam-Rezeptorproteine zusammen mit ^{14}C oder ^3H radioaktiv markierten Penicillinen eingesetzt. Das Ergebnis wird rein instrumentell mit einem Scintillationsmesser bestimmt, wobei auch hier der Messwert umgekehrt proportional zur Konzentration des β -Laktamantibiotikums in der Probe ist. Der apparative Aufwand und der Umgang mit radioaktiven Substanzen beschränkten den Einsatz dieses Testverfahrens auf entsprechend ausgerüstete Labors. Auch mit diesem Test ist eine genauere Differenzierung innerhalb der β -Laktame nicht möglich (CARLSSON et al., 1992; CHARM und CHI, 1988; HEESCHEN und SUHREN, 1986; KROLL, 2000; SCHÄLLIBAUM, 1986b;). Die Nachweisgrenze für Cefquinom ist in Tabelle 3 angegeben.

Im Gegensatz zu den mikrobiologischen Verfahren weist die Mehrzahl der kommerziell verfügbaren Rezeptortests ausreichend hohe Testsensitivität auf, um Cefquinom im Bereich der MRL-Konzentrationen zu erfassen. Dies ist auch aus rechtlicher Hinsicht von Bedeutung, da so vor der Milcherfassung in der Molkerei Cefquinom-Rückstände mittels der in Deutschland gebräuchlichen Schnellnachweise (beta-Star, SNAP β -Laktam) auf Tankwagenebene sicher erfasst werden können.

2.4.3 *Enzymatischer Nachweis*

Das Prinzip des enzymatischen Nachweises von β -Laktamantibiotika, der Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts in der Milchuntersuchung eingeführt worden war, basiert auf der Fähigkeit der β -Laktame, das Enzym R39-DD-Carboxypeptidase zu inaktivieren. Dieses Enzym hydrolysiert RD-Alanin-D-Alanin, wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Dieses bewirkt bei einem zugemischten Redoxfarbstoff einen Farbumschlag. Da die β -Laktame mit dem Enzymsubstrat RD-Alanin-D-Alanin strukturverwandt sind, bilden sie irreversible Komplexe mit dem Enzym und hemmen so die Farbreaktion. Anhand einer

mitgelieferten testspezifischen Farbtafel, wird die Farbreaktion ausgewertet. Dieser Testaufbau wurde erstmals von FRÈRE et al. (1980) vorgestellt. Der Penzym Test wird in verschiedenen Modifikationen angeboten (z.B. Penzym S, Penzym 50), welche sich in ihrer Empfindlichkeit für β -Laktame unterscheiden. Einzelne Penicilline und Cephalosporine werden unterhalb der MRL-Grenze nachgewiesen (DEGELAEN, 1994; PENZYM, 1994; SCHNEIDER et al., 1994; SUHREN et al., 1996a). Die Nachweisempfindlichkeit aller drei Testvarianten (Penzym, Penzym S und Penzym 50) für Cefquinom (Tabelle 3) ist jedoch als unzureichend anzusehen.

2.4.4 *Immunologische Verfahren*

Das Spektrum an immunologischen Verfahren hat sich in den letzten 20 Jahren durch das wachsende Interesse der Analytik nach schnellen, kostengünstigen und sensitiven Nachweisverfahren stark erweitert. Sie werden nicht nur in der Lebensmittelkontrolle immer häufiger eingesetzt. Der Nachweis einer Substanz wird dabei über gegen diese Substanz gerichtete Antikörper geführt. Während früher das Ergebnis vor allem durch radioaktive Markersubstanzen (Radio Immunassay = RIA) sichtbar gemacht wurde, stehen heute verschiedene Enzymreaktionen (Enzyme Immunassay = EIA) und fluoreszierende bzw. lumineszierende Substanzen im Vordergrund (ALLEN, 1989; SMITH, 1989; MÄRTLBAUER, 1993). Der ursprünglich von ENGVALL und PEARLMAN (1971) geprägte Begriff ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) wird heute häufig durch den allgemeineren Ausdruck EIA (Enzyme immunoassay) ersetzt. Niedermolekulare Substanzen wie beispielsweise Antibiotika können in der Praxis nur mit sogenannten kompetitiven Testsystemen nachgewiesen werden, bei denen markiertes und unmarkiertes Antigen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen konkurrieren (EKINS, 1989; JOCKERS et al. 1993).

Enzymimmunologische Verfahren werden häufig als Screening-Verfahren zur Untersuchung größerer Probenmengen eingesetzt. Ein Vorteil gegenüber den mikrobiologischen Verfahren ist die Möglichkeit der Identifizierung und Quantifizierung bestimmter Substanzen (SPINKS, 2000; USLEBER et al., 1994a).

Die Anwendungsmöglichkeiten wurden durch verschiedene Testaufbauten erweitert und auch als kommerziell erhältliche Schnelltests umgesetzt (NEAVES, 1999; HUTH et al., 2002). Die Sensitivität und die Spezifität solcher Tests sind von den jeweils entwickelten Antikörpern und vom Testaufbau abhängig (NGO und LENHOFF, 1982; OELLERICH, 1984; EKINS, 1989; PORSTMANN und KIESSING, 1992; RITTENBURG, 1989).

Für einen gruppenspezifischen Nachweis von Penicillinen wurden Antikörper entwickelt, die sich gegen das 6-Amino-penicilloylsäure-Grundgerüst richten (KURZ et al., 1994; USLEBER et al., 1998), welches in der Grundstruktur aller Penicillinderivate vorhanden ist. Dieses Testsystem wurde später für den Nachweis von Penicillinen in Milch verbessert (STRASSER et al., 2003). Andere Antikörper wiesen Teilspezifität für Isoxazolyl-Penicilline auf (USLEBER et al., 1994b; DIETRICH et al., 1996). Weitere Antikörper erfassten beispielsweise spezifisch die amphoteren Penicilline Ampicillin und Amoxicillin, jedoch oberhalb des jeweiligen MRL (CLIQUET et al., 2001; DIETRICH et al., 1998).

Im Gegensatz zu den Penicillinen ist der β -Laktamring bei den Cephalosporinen mit einem 6-gliedrigen Dihydrothiazinring anstatt eines 5-gliedrigen Thiazolidinringes verknüpft (Abbildung 1). Dieser Unterschied zwischen dem Penam-Grundgerüst (Penicilline) und dem 3-Cephem-Grundgerüst (Cephalosporine) besitzt immunologisch große Bedeutung, insbesondere weisen Antikörper gegen Penicilline keine messbaren Kreuzreaktionen mit Cephalosporinen auf und umgekehrt.

Während für die Penicilline gruppenspezifische Antikörper gegen das Penam-Grundgerüst entwickelt werden konnten (DIETRICH et al., 1998; STRASSER et al., 2003; USLEBER et al., 1998) richten sich Antikörper gegen Cephalosporine vornehmlich gegen die Substituenten der Seitenketten (Abbildung 2) an Position 3 und 7, so dass eine Gruppenspezifität bisher nicht erreicht wurde. Gegen Cefotiofur und Cephalexin entwickelte EIAs zeigten nach Angaben der Autoren nur eine geringe Kreuzreaktion mit anderen Cephalosporinen aber keine mit Penicillinen (KACHAB et al., 1992; KITAGAWA et al., 1988; STANKER et al., 1998).

Für Cefquinom wurde bis jetzt noch kein spezifischer EIA beschrieben. Dies gilt auch für einige andere Cephalosporine mit MRL-Wert (Abbildung 2).

2.4.5 *Physikalisch-chemische Nachweisverfahren*

Methodenentwicklungen zum physikalisch-chemischen Nachweis von β -Laktamantibiotika sind überwiegend als Multimethoden zur gleichzeitigen Erfassung möglichst vieler relevanter Verbindungen beschrieben worden. (BOBBIT und NG, 1992; BOISON, 1992; SCHENK, 1998). Cephalosporine können im Gegensatz zu Penicillinen aufgrund ihrer ausgeprägten UV-Absorptionseigenschaften nach chromatographischer Trennung ausreichend empfindlich mittels UV-Detektion nachgewiesen werden. Mehrere HPLC-Verfahren mit UV-Detektion, zumeist bei einer Wellenlänge von 270 nm, wurden von verschiedenen Autoren beschrieben:

Das im Rahmen des MRL-Verfahrens für Cefquinom entwickelte und von der EMEA zitierte Nachweisverfahren beruht auf einer recht aufwendigen Probenvorbereitung mittels „Matrix Solid Phase Dispersion“ und anschließender HPLC-UV-Detektion. Die angegebene Nachweisgrenze für Gewebeproben liegt zwischen 0,01 bis 0,05 $\mu\text{g/g}$ (EMEA, 1995). Zum Nachweis von Cefquinom in Milch wurde im Rahmen des Zulassungsverfahrens durch die EMEA eine Reversed-Phase HPLC mit einer Nachweisgrenze von 10 $\mu\text{g/kg}$ und einer Quantifizierungsgrenze von 15 $\mu\text{g/kg}$ validiert (EMEA, 1995).

Mit der von SØRENSEN und SNOR (2000) beschriebenen LC-UV-Methode wurden erstmalig gleichzeitig mehrere Cephalosporine (Cefazolin, Cefoperazon, Ceftiofur und Cefquinom) nachgewiesen. Bei einer Wiederfindungsrate von ca. 70% konnten diese Autoren Cefquinom-Zusätze in Milch mit einer Nachweisgrenze von ca. 7 ng/ml bestimmen. SUHREN und KNAPPSTEIN (2003) beschrieben eine LC mit UV-Detektion für Cefquinom mit einer Nachweisgrenze von 2 $\mu\text{g/kg}$ in Milch und einer Wiederfindungsrate von 93%, dieses Verfahren wurde als Referenzmethode für die Cefquinom-Analytik im Rahmen von Ausscheidungsversuchen bei laktierenden Kühen eingesetzt (KNAPPSTEIN et al., 2003a; KNAPPSTEIN et al., 2005).

In jüngerer Zeit wurden auch vermehrt Kombinationen von Flüssigkeitschromatographie und Tandem-massenspektrometrischer Detektion (LC-MS/MS) zum Nachweis von Antibiotikarückständen beschrieben, darunter auch Multimethoden für

β -Laktamantibiotika in Milch (BRUNO et al., 2001; HOLSTEGE et al., 2002; RIEDIKER und STADLER, 2001). Cefquinom wurde allerdings als Analyt bei den meisten dieser Verfahren nicht berücksichtigt. Im Rahmen der Erweiterung der Zulassung von Cefquinom zur Anwendung beim Pferd (EMA, 2003) wurde ein Verfahren zur Bestimmung von Cefquinom mittels HPLC-MS/MS ab einer Konzentration von 0,7 $\mu\text{g/kg}$ in Muskel-, 0,8 $\mu\text{g/kg}$ in Leber-, 7 $\mu\text{g/kg}$ in Nieren- und 0,3 $\mu\text{g/kg}$ in Fettgewebe vorgelegt. BECKER et al. (2004) beschrieben eine Multimethode zum Nachweis von 15 β -Laktamantibiotika in Milch, Nieren und Muskelgewebe. Für Cefquinom in künstlich kontaminierten Milchproben wurden bei Zusätzen von 10-40 $\mu\text{g/l}$ mittlere Wiederfindungsraten von 80-93% ermittelt. Problematisch ist allerdings bei LC-MS/MS-Methoden derzeit noch die teilweise starke und schlecht kontrollierbare Beeinflussung durch Probenmatrixeffekte. Zudem stehen der relativ hohe Arbeitsaufwand und die hohen Untersuchungskosten einer breiten Anwendung derzeit entgegen. LC-UV bzw. LC-MS/MS sind somit als reine Referenzverfahren anzusehen. Hier sind auch die für diese Methoden benötigten Probenvolumina von mindestens 20-30 ml möglicherweise problematisch, da gerade in strittigen Fällen diese Probenmengen oft nicht mehr zur Verfügung stehen.

Tabelle 3: Nachweisgrenzen kommerziell erhältlicher Testverfahren für Cefquinom in Milch (MRL = 20 µg/kg)

Testsystem, Bezeichnung	Hersteller	Testprinzip	Nachweisgrenze Cefquinom, µg/l	Referenz
BRT-MRL-Suchtest	AIM GmbH	Agardiffusionstest	40-60	AIM, 2004
BR-Test AS Brillant	DSM Food Specialities	Agardiffusionstest	100	DSM FOOD SPECIALITIES, 2002a
BR-Test AS Spezial	DSM Food Specialities	Agardiffusionstest	90 - >250	KROLL et al., 1999; DISERENS, 2002; KNAPPSTEIN et al., 2005
Delvo SP	DSM Food Specialities	Agardiffusionstest	75-150	SUHREN und KNAPPSTEIN, 2003; DSM FOOD SPECIALITIES, 2002b; KNAPPSTEIN et al., 2005
Valio T 101	Valio Ltd.	Agardiffusionstest	50-100	VALIO Ltd., 2004
Copan Test P&S	Chr. Hansen GmbH	Agardiffusionstest	30-100	MUIR und WEST, 1999; DISERENS, 2002
Charm Rosa	Charm Sciences Inc.	Rezeptortest	15-20	DISERENS, 2002
Charm-II-Betalactames	Charm Sciences Inc.	Rezeptortest (Radiologisch)	<20	DISERENS, 2002; SUHREN und REICHMUTH, 1998b
βeta s.t.a.r.	Chr. Hansen GmbH	Rezeptortest	10-12,5	KROLL et al., 1999; KNAPPSTEIN et al., 2005
SNAP Betalactam	IDEXX Inc.	Rezeptortest	20 22,5-27,5	KROLL et al., 1999; SUHREN und REICHMUTH, 1998a; DISERENS, 2002
Penzym	Chr. Hansen GmbH	Rezeptortest	50	WALTE, 1996; PENZYM, 2004

Fortsetzung Tabelle 3:

Testsystem, Bezeichnung	Hersteller	Testprinzip	Nachweisgrenze Cefquinom, µg/l	Referenz
Penzym S	Chr. Hansen GmbH	Rezeptortest	45	WALTE, 1996
Penzym 50	Chr. Hansen GmbH	Rezeptortest	40	KROLL et al., 1999
Delvo-X-Press	DSM Food Specialities	Rezeptortest	40	KROLL et al., 1999

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aceton	Merck KGaA, 1.00013.1000
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Chemie GmbH, A-9647
1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI)	Sigma Chemie GmbH, C-7625
Casein-Na-Salz	Sigma Chemie GmbH, C-8654
Essigsäure 96%	Merck KGaA, 1.00062.1000
Ethanol (zur Synthese)	Merck KGaA, 1.00971.1000
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (CD)	Sigma Chemie GmbH, E-7750
Freund'sches Adjuvans, komplett	Sigma Chemie GmbH, F-5881
Glukoseoxidase (GOx)	Sigma Chemie GmbH, G-7016
Glutardialdehyd (GA)	Sigma Chemie GmbH, G-5882
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, 1.04877
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, 1.06586
Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)	Calbiochem-Novabiochem Corporation, 374805
Magermilchpulver (MMP)	Merck KGaA, 1.15363.0500
Meerrettichperoxidase (HRP)	Roche Diagnostics, 92392525
Natriumborhydrid	Aldrich, 21,346-2
Natriumchlorid	Merck KGaA, 1.06404
Natrium-meta-Perjodat (PJ)	Sigma Chemie GmbH, S-1878
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma Chemie GmbH, T-2885
p-Benzoquinon (BQ)	Sigma Chemie GmbH, B-1266
Tween 20	Sigma Chemie GmbH, P-1379
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, 1.07209.0250

Alle verwendeten Reagenzien lagen mindestens in der Reinheitsstufe p.a. vor.

3.1.2 Antibiotika

Amoxicillin	Sigma Chemie GmbH, A-8523
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, A-9518
Cefacetril-Natriumsalz	Novartis, 97120050Z1
Cefaclor	Sigma Chemie GmbH, C-6895
Cefadroxil	Sigma Chemie GmbH, C-7020
Cefalexin-Hydrat	Sigma Chemie GmbH, C-4895
Cefalonium	Schering-Plough, Bray, Lot 01179 A004
Cefapirin-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-8270
Cefazolin-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-5020
Cefmandol-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-7145
Cefmetazol-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-6048
Cefoperazon-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-4292
Cefotaxim-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-7912
Cefoxitin-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-4786
Cefquinom-Sulfat	wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Intervet Innovation GmbH, Batch 01-01 v. 10.06.03
Cefsulodin Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-8145
Ceftiofur-Natriumsalz	Pharmacia/Upjohn, Lot 43 CTD
Ceftriaxon	Sigma Chemie GmbH, C-5793
Cefuroxim-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-4417
Cephadrin	Sigma Chemie GmbH, C-8395
Cloxacillin-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, C-9393
Dicloxacillin-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, D-9016
Nafcillin-Natriumsalz-Monohydrat	Sigma Chemie GmbH, N-3269
Oxacillin-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, O-1002
Penicillin-G-Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, P-3032

3.1.3 *Puffer und Lösungen*

0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)

2% Casein-PBS-Lösung

0,21 mol/l Citratpuffer (mit Zusatz von 3,15 mmol/l H₂O₂, pH 3,9)

1 mmol/l Natriumacetatpuffer (pH 4,4)

0,1 mol/l Natrium-Bicarbonat-Puffer (pH 8,5)

0,9% Natriumchloridlösung

0,1 mol/l Phosphatpuffer (pH 6,8)

0,01 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid (pH 7,3) (PBS)

1 mol/l Schwefelsäure

Enzymsubstrat-/Chromogenlösung für Meerrettichperoxidase (nach GALLATI und PRACHT, 1985): 20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂-Zusatz und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung

Tetramethylbenzidinlösung (1 mmol 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 5 ml Aceton und 45 ml Methanol)

Waschlösung (0,15 mol/l Natriumchlorid mit Zusatz von 0,025 % Tween 20)

3.1.4 *Immunreagenzien*

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG

Sigma Chemie GmbH, R-2004

Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-

Dako Cytomation A/S, P-0217

Meerrettichperoxidasekonjugat

3.1.5 *Geräte und sonstige Materialien*

Computer

AMD Athlon

Datenverarbeitungssoftware Magellan 2.5

Tecan Austria GmbH

Datenverarbeitungssoftware RIDAWIN

r-Biopharm, Darmstadt

Dialyseschläuche 16 mm Durchmesser

Visking 44110

Dialyseschläuche 6 mm Durchmesser

Servapor 44139

Dialyseschläuche 6 mm Durchmesser

Visking, 44104

ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise	Tecan GmbH, Crailsheim
Indikatorpapier	Merck KGaA, 1.09531.0001 Acilit
Indikatorpapier	Merck KGaA, 1.09532.0001 Alkalit
Indikatorpapier	Merck KGaA, 1.09533.0001 Neutralit
Mikrotiterplatten Nunc Immuno Plate 439454	Nunc GmbH
Mikrotiterplattentaumelgerät KS 250 basic	IKA® Labortechnik
Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040	Heidolph GmbH
pH-Meter inolab Level 1 mit Sen Tix HW Elektrode	WTW
Photometer UV-1601	Shimadzu
Sartorius Waage Basic plus	Sartorius AG
Sartorius Waage Master Pro LA	Sartorius AG
Variable 12-Kanalpipette 10-100 µl	Eppendorf AG
Variable 12-Kanalpipette 50-300 µl	Finipette Labsystems
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG
Vortex Genie 2	Scientific Industries inc.
Zentrifuge Kendro Multifuge 3 S-R	Heraeus Christ GmbH

3.1.6 Probenmaterial

Konsummilch (Vollmilch 3,5% Fett, pasteurisiert, homogenisiert)	Einzelhandelsgeschäfte im Raum Giessen
Rohmilch, hemmstofffrei	Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer der Justus-Liebig-Universität Gießen, Prof. Dr. K. Doll, Frankfurter Straße 110, 35392 Gießen.

3.2 Methodik

3.2.1 Herstellung der Immunoreagenzien

Da Cefquinom als niedermolekulare Verbindung (Hapten) in intakter Struktur *per se* keine Immunantwort hervorzurufen vermag, wurde es zur Herstellung eines Immunogens an ein Trägerprotein gebunden. Gleichzeitig mussten zur Sicherstellung der strukturellen Integrität des 3-Cephem-Grundgerüsts, insbesondere zur Vermeidung einer Spaltung des β -Laktamrings, möglichst schonende Reaktionsbedingungen gewählt werden. Zur Kopplung von Cefquinom an Proteinträger bieten sich die Carboxylgruppe an C2 des Grundgerüsts sowie die primäre Aminogruppe des Substituenten an C7 des β -Laktamrings an (Abbildung 3).

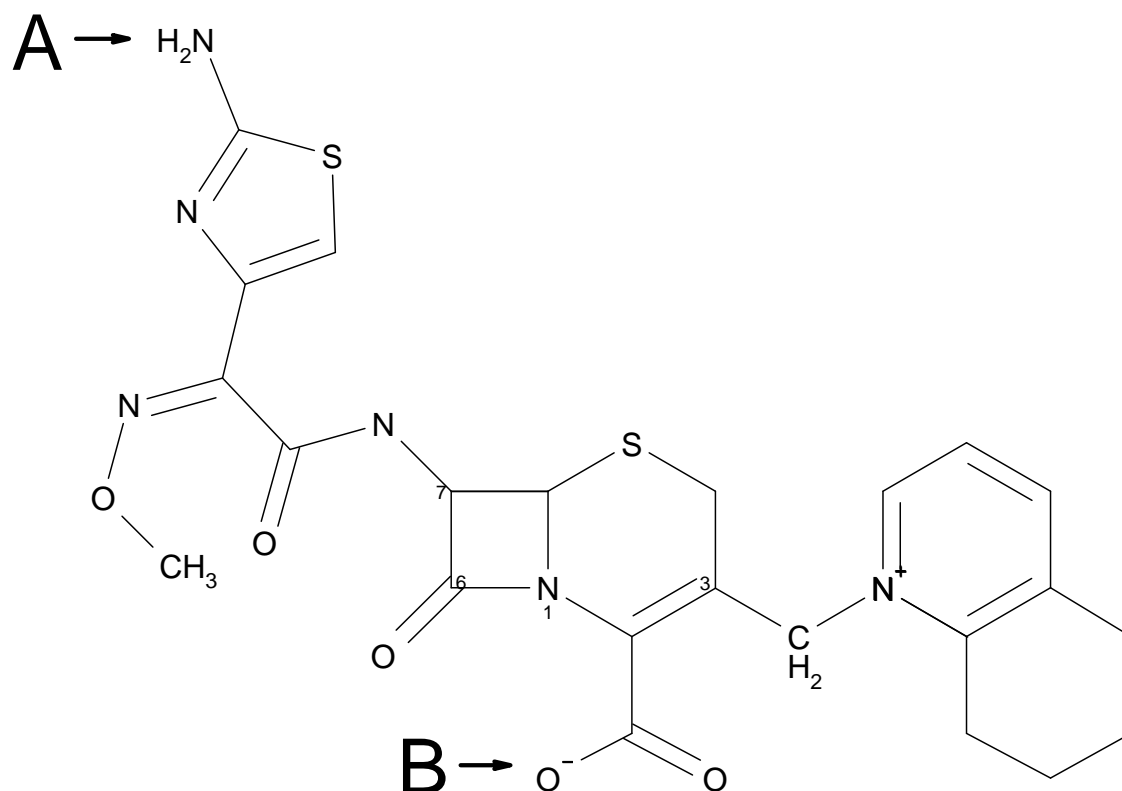


Abbildung 3: Strukturformel von Cefquinom. Die möglichen Kopplungsstellen zur Synthese von Cefquinom-Proteinkonjugaten sind mit A (Aminogruppe des Substituenten an C7) bzw. B (Carboxylgruppe im 3-Cephemring an C2) gekennzeichnet.

Aufgrund der Erfahrungen mit anderen, vergleichbaren Haptenen (MÄRTLBAUER et al., 1992; OSTERMAIER, 1994; SCHNAPPINGER et al., 1993; USLEBER et al., 1998)

wurden für Cefquinom mehrere ein- bzw. zweistufige Synthesereaktionen getestet, die ausschließlich oder bevorzugt über eine Kopplung an der primären Aminogruppe bzw. an der Carboxylgruppe arbeiten (Abbildung 3) und bei denen keine Trennung bzw. Aufreinigung eines Intermediär-Derivats erforderlich ist. Im Folgenden werden die jeweiligen verwendeten Kopplungsmethoden beschrieben.

3.2.1.1 Kopplung mittels Glutardialdehydkondensation (GA)

Die Glutardialdehydmethode fand bei der Kopplung von Cefquinom an die Trägerproteine Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), bovines Serumalbumin (BSA) sowie das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) Anwendung. Prinzipiell findet hier eine Vernetzung freier Aminogruppen durch die Aldehydgruppen des homobifunktionellen Kopplungsreagenzes Glutardialdehyd (AVRAMEAS, 1969; AVRAMEAS und TERNYNCK, 1969) statt (Abbildung 4).

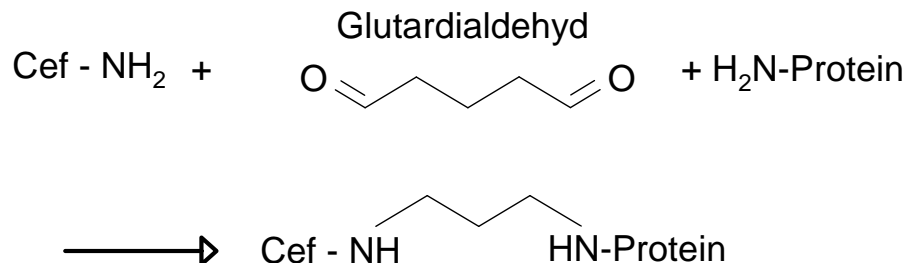


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Kopplung von Cefquinom (CEF) an Proteinträger mittels Glutardialdehyd als homobifunktionalem Reagenz.

Zur Verwendung als Immunogen in Kaninchen wurde Cefquinom an KLH gekoppelt. Hierzu wurden Cefquinomsulfat, Glutardialdehyd und Trägerprotein in einem molaren Verhältnis von 10000:10000:1 eingesetzt. Cefquinomsulfat (25 mg) wurde in 2 ml PBS gelöst. KLH (20 mg) wurde in 2 ml PBS gelöst und zur Cefquinom-Lösung gegeben. Zu dieser Mischung wurden tropfenweise 160 µl einer wässrigen Glutardialdehydlösung (25 mg/ml) gegeben. Nach 3 h Inkubationszeit unter Rühren im Dunkeln bei Raumtemperatur

wurde der das Kopplungsprodukt (Cefquinom-GA-KLH) 24 h gegen PBS (3 x 6 l) dialysiert. Auf analoge Weise wurde Cefquinom an BSA (Cefquinom-GA-BSA) bzw. an HRP (Cefquinom-GA-HRP) gekoppelt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Eingesetzte Reaktionsmengen bei der Kopplung von Cefquinom an Makromoleküle mittels Glutardialdehyd

mg Cefquinom (gelöst in)	Protein (Menge (mg), gelöst in)	Zugabe Glutardial- dehydlösung, µl (Konzentration in mg/ml A. dest)	Reaktions- zeit (h)
25 (2 ml PBS)	KLH (20 mg in 2 ml PBS)	160 (25)	3
25 (2 ml PBS)	BSA (27,2 mg in 2 ml PBS)	160 (25)	3
36 (5 ml A. dest)	HRP (24 mg in 1,5 ml A. dest.)	500 (11,4)	24

3.2.1.2 Kopplung mittels wasserlöslichem Carbodiimid (CD)

Analog zu der für Ampicillin beschriebenen Reaktion (USLEBER et al., 1998) wurde Cefquinom mittels wasserlöslichem Carbodiimid (CD) an HRP, BSA bzw. Glucose Oxidase gekoppelt. Bei dieser Reaktion können sowohl die primäre Aminogruppe als auch die Carboxylgruppe des Dihydrothiazinringes an der Reaktion teilnehmen. In einer einstufigen Reaktion entstehen an den Carboxylgruppe des Dihydrothiazinringes von Cefquinom bzw. an freien Carboxylgruppen des Trägerproteins durch das im Überschuss zugegebene Carbodiimid O-Acylisoharnstoffe, die mit freien Aminogruppen des Proteins bzw. von Cefquinom unter Bildung eines Amids und eines Harnstoffderivates reagieren (WONG, 1993). Bei dieser Reaktion (Abbildung 5) sind zahlreiche Nebenreaktionen beschrieben worden (MÄRTLBAUER, 1993).

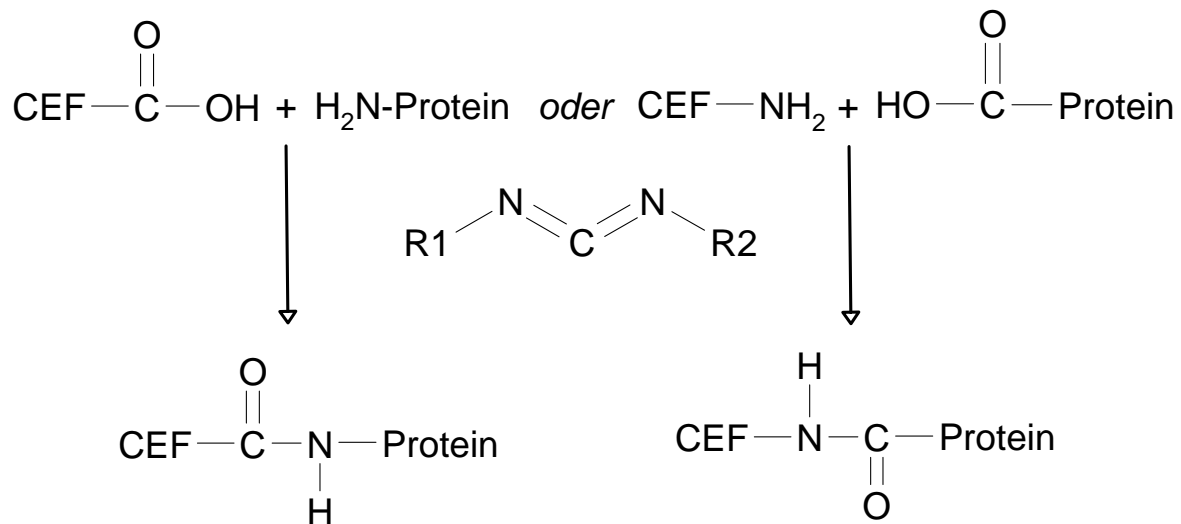


Abbildung 5: Schematische Darstellung der beiden möglichen Kopplungsreaktionen von Cefquinom (CEF) an Trägerproteine mittels wasserlöslichem Carbodiimid (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid).

Für die Herstellung von Cefquinom-CD-HRP wurden Cefquinomsulfat, Carbodiimid und HRP in einem molaren Verhältnis von 100:100:1 eingesetzt. Hierzu wurden zunächst 5 ml Cefquinomsulfatlösung (7,2 mg Cefquinom je ml A. dest.) und 1,5 ml HRP-Lösung (15,4 mg HRP/ml A. dest.) miteinander gemischt. Zu dieser Mischung wurden 0,5 ml einer wässrigen Carbodiimid-Lösung (22 mg Carbodiimid/ml A. dest.) dazugegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln unter leichtem Rühren 24 h inkubiert und anschließend das Kopplungsprodukt (Cefquinom-CD-HRP) 24 h gegen 3 x 6 l PBS dialysiert.

Das gleiche Syntheseprotokoll wurde für die Herstellung von Cefquinom-CD-BSA und Cefquinom-CD-GOx verwendet. Für die Herstellung von Cefquinom-CD-BSA wurden 1,742 ml Cefquinomsulfatlösung (7,2 mg/ml A. dest.) mit 0,523 ml BSA-Lösung (25,6 mg/ml A. dest.) und 0,174 ml Carbodiimid-Lösung (22 mg/ml A. dest.) zur Reaktion gebracht. Für die Herstellung von Cefquinom-CD-GOx wurden 1,5 ml Cefquinomsulfat-Lösung (7,2 mg/ml A. dest.), 0,45 ml GOx-Lösung (57,4 mg/ml A. dest.) und 0,15 ml Carbodiimid-Lösung (22 mg/ml A. dest.) eingesetzt.

3.2.1.3 Kopplung mittels Carbonyldiimidazol (CDI)

Diese Methode wurde, analog zu der von XIAO et al. (1995) für das Mycotoxin Ochratoxin A beschrieben, zur Kopplung von Cefquinom an BSA getestet. Bei dieser Methode reagiert 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) mit Carboxylgruppen (aber auch mit Hydroxylgruppen) unter Bildung von reaktiven N-Acylimidazol-Intermediärprodukten. Diese gehen in einem zweiten Reaktionsschritt mit Aminogruppen von Proteinen über nukleophile Additionsreaktionen Amidbindungen ein (Abbildung 6), wobei das Hapten ohne „Spacer“ direkt an das Protein gebunden wird (AXEN, 1974).

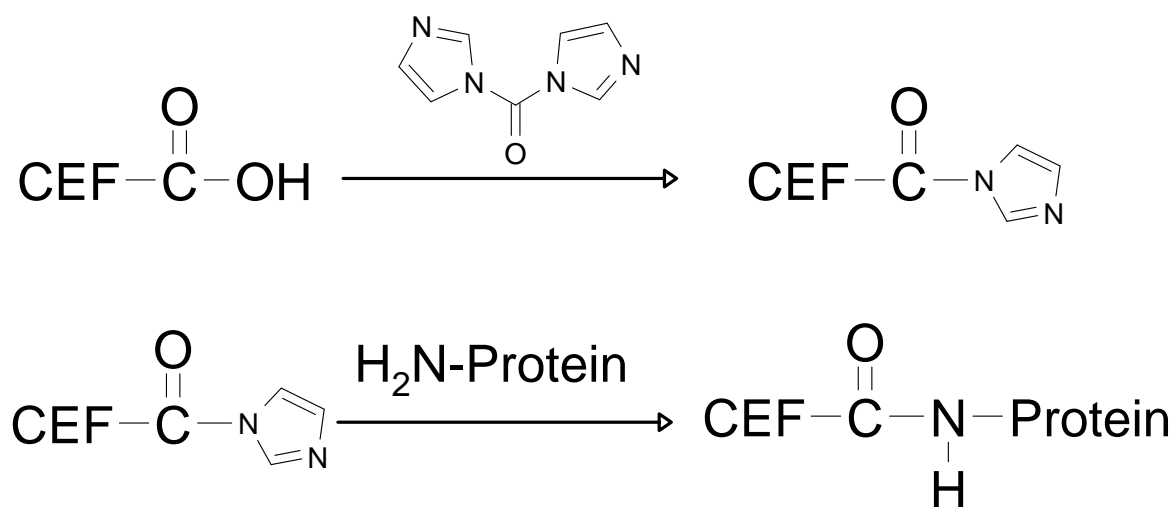


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kopplung von Cefquinom (CEF) an Trägerproteine unter Verwendung von 1,1-Carbonyldiimidazol als Kopplungsreagenz.

Cefquinom, CDI und BSA wurden in einem molaren Verhältnis von 60:20:1 zur Reaktion gebracht. Hierzu wurden zunächst 3,1 mg Cefquinom und 3 mg CDI in insgesamt 0,2 ml Aceton gelöst und 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde dieser Ansatz tropfenweise zu 2 ml BSA-Lösung (10 mg/ml 0,1 mol/l Na-Bicarbonatpuffer) gegeben. Nach 2 h Inkubation unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde das Kopplungsprodukt (Cefquinom-CDI-BSA) 24 h gegen 3 x 6 l PBS dialysiert.

3.2.1.4 Kopplung mittels reduktiver Alkylierung unter Verwendung von Natriumperjodat (PJ)

Mit der zweistufigen reduktiven Alkylierung unter Verwendung von Natriumperjodat („Natriumperjodatmethode“, WILSON und NAKANE, 1978) wurde Cefquinom an HRP gekoppelt. Natriumperjodat oxidiert die Kohlenhydratanteile des Glycoproteins HRP, die dadurch generierten freien Aldehydgruppen reagieren zunächst unter Bildung einer Schiff'schen Base mit der Aminogruppe des Antibiotikums. Durch die folgende Reaktion mit Natriumborhydrid werden diese zu stabilen Aminen reduziert (Abbildung 7).

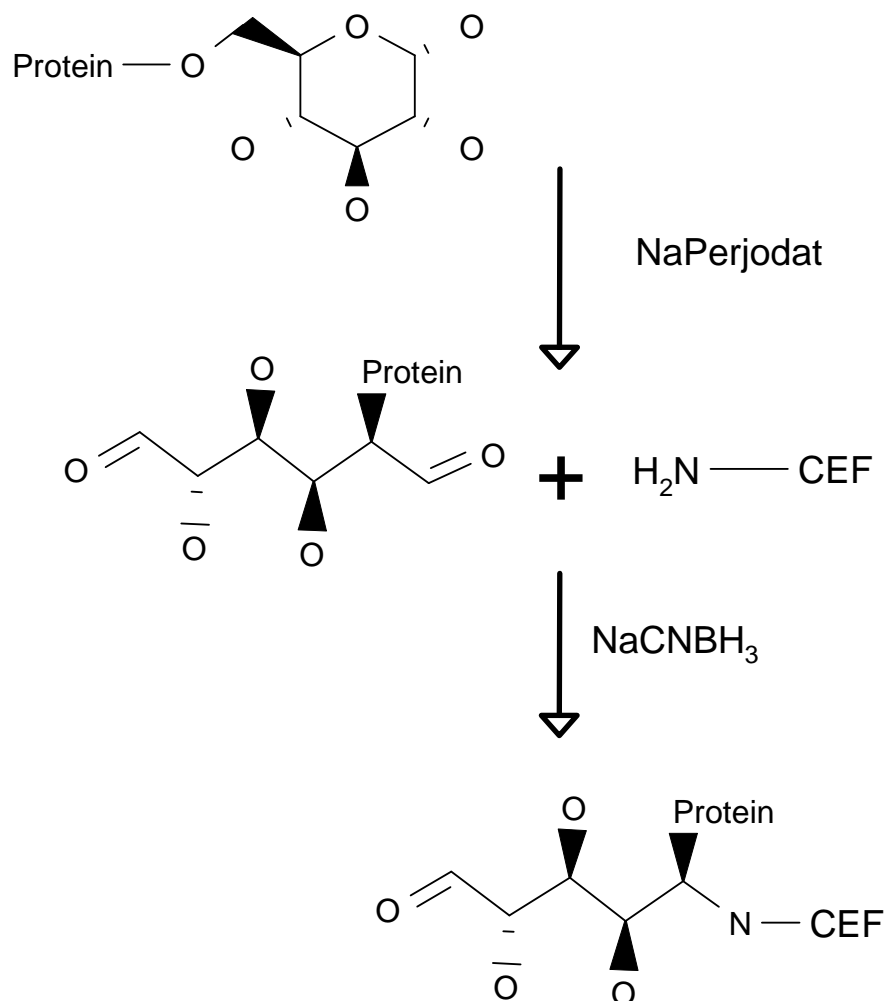


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Kopplung von Cefquinom (CEF) und Meerrettichperoxidase mittels reduktiver Alkylierung (Perjodatmethode).

Zur Durchführung der Reaktion wurde HRP (13,3 mg) in 1 ml A. dest. gelöst und mit 0,2 ml Natriumperjodat (21,4 mg/ml A. dest.) in einem molaren Verhältnis von 1 zu 30 gemischt und dadurch aktiviert. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur (Lichtgeschützt) wurde der Ansatz 24 h gegen 3 x 6 l Natriumacetatpuffer dialysiert. Zur aktivierten HRP-Lösung wurde 1 ml einer wässrigen Cefquinom-Lösung (20,77 mg/ml A. dest.) gegeben und der pH-Wert durch Zugabe von insgesamt 0,555 ml Natronlauge (0,1 mol/l) auf ca. 9,5 eingestellt. Nach 2 h und wiederholter pH-Kontrolle wurde 0,1 ml einer wässrigen Natriumborhydrid-Lösung (4 mg/ml A. dest.) zum Ansatz gegeben und eine weitere Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Kopplungsprodukt (Cefquinom-PJ-HRP) 24 h gegen 3 x 6 l PBS dialysiert.

3.2.1.5 Kopplung mittels para-Benzoquinon (BQ)

Para-Benzoquinon bindet sich primär an Sulfhydryl- und Aminogruppen. Mit dieser Reaktion wurde Cefquinom an HRP gekoppelt (TERNYNCK und AVRAMEAS, 1976), in Anlehnung an eine von OSTERMAIER (1994) für Sulfonamide beschriebenen Kopplung. Dabei reagiert p-Benzoquinon in einer zweistufigen Reaktion zunächst im schwach sauren Milieu mit freien Aminogruppen der HRP, in einem zweiten Schritt wird das aktivierte Intermediärprodukt unter schwach alkalischen Bedingungen mit dem Antibiotikum gemischt, wobei hier ebenfalls freie Aminogruppen des Haptens reagieren (Abbildung 8).

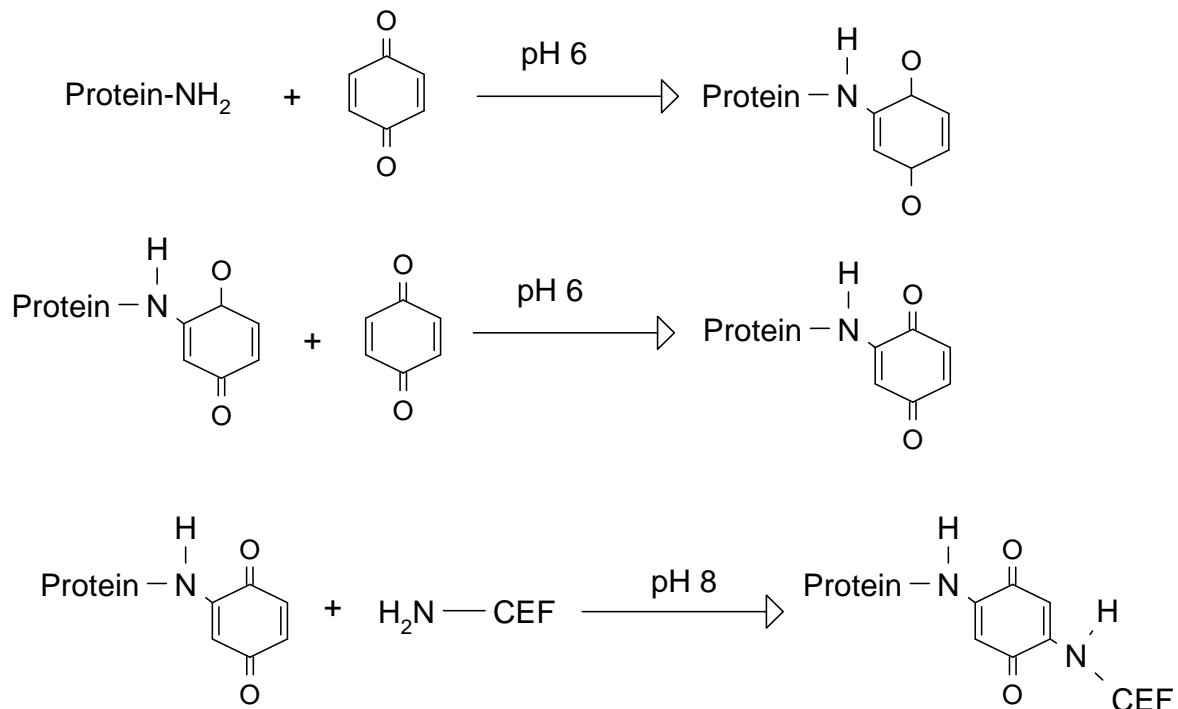


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Kopplung von Cefquinom (CEF) an Meerrettichperoxidase mittels p-Benzoquinon.

HRP (10 mg) wurde in 1 ml Phosphatpuffer (pH 6) gelöst, p-Benzoquinon (2,5 mg) in 0,1 ml Ethanol (96%). Beide Lösungen wurden gemischt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 24 h gegen 3 x 6 l Kochsalzlösung (0,9%) dialysiert. Der dialysierte Reaktionsansatz wurde mit 1 ml Cefquinom-Lösung (10 mg/ml A. dest.) gemischt und der pH-Wert des Reaktionsansatzes mit 1,4 ml Bicarbonatpuffer auf ca. 8 eingestellt. Das Kopplungsprodukt (Cefquinom-BQ-HRP) wurde 36 h bei 4 °C unter leichtem Rühren inkubiert und anschließend 24 h gegen 3 x 6 l PBS dialysiert.

3.2.1.6 Charakterisierung der hergestellten Cefquinom-Konjugate

Die qualitative Überprüfung des Kopplungserfolgs der hergestellten Cefquinom-Protein(bzw. HRP)-Konjugate erfolgte durch Aufnahme ihrer UV-Spektren im Bereich von 200-400 nm und einem Vergleich mit den jeweiligen Spektren für Cefquinom bzw. äquimolarer Konzentrationen der nicht konjugierten Proteine. Soweit dies aufgrund von

Überlagerungen der Absorptionsmaxima im Bereich von 260-280 nm für Proteinlösungen und für Cefquinom-Lösungen (265 nm) möglich war, wurde aufgrund der Subtraktion der Extinktionswerte bei 265 nm von Konjugatlösung und Proteinlösung die Kopplungsrate abgeschätzt (GOLDFARB et al., 1951). Die Proteinkonzentration der Konjugate wurde aufgrund der eingesetzten Mengen unter Berücksichtigung der UV-Absorption bei 280 nm abgeschätzt. Alle Konjugate wurden portioniert und bei -18 °C gelagert.

3.2.2 Gewinnung spezifischer Anti-Cefquinom-Antisera

3.2.2.1 Immunisierung

Vier weibliche Kaninchen der Rasse Chinchilla-Bastard (Charles River, Kißlegg) mit einem Gewicht von etwa 2 kg wurden nach der Methode von NIESCHLAG et al. (1975) immunisiert. Hierzu wurde ein Volumenanteil des in PBS gelösten Immunogen Cefquinom-KLH (0,5 ml) mit drei Volumenanteilen komplettem Freund'schem Adjuvans (1,5 ml) emulgiert. Zwei Milliliter der Emulsion wurden jedem Kaninchen an der seitlichen Brustwand intrakutan, auf je 10 Stellen verteilt, appliziert. In der 12., 19. und 38. Woche nach Grundimmunisierung wurden die Tiere mit jeweils 2 ml der gleichen Immunogenmischung subkutan restimuliert. Der Zeitpunkt der Restimulierung wurde in Abhängigkeit vom Titerverlauf gewählt.

Die vier immunisierten Tiere wurden entsprechend ihrer Tätowiernummer als K17, K18, K19 und K20 bezeichnet.

3.2.2.2 Blutentnahme und Serumgewinnung

Ab der 5. Woche nach Grundimmunisierung wurde von den Kaninchen in 1-2 wöchigen Abständen Blut genommen. Dazu wurde aus der *Arteria auricularis rostralis* jedes Kaninchens Blut entnommen und durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 1942 x g das Serum gewonnen. Dieses wurde portioniert und bei -18 °C ohne weitere Behandlung eingefroren.

3.2.2.3 Kontrolle des Immunisierungsverlaufs

Der Verlauf der Serumtiter der immunisierten Tiere wurde im indirekten enzymimmunologischen Testverfahren (ELISA/EIA) kontrolliert. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit Cefquinom-CD-GOx-Konjugat in einer Konzentration von 2,5 µg/ml PBS beschichtet (100 µl/Kavität). Die Platten wurden 24 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ausschlagen der Platten wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 2%igem Casein/PBS abgesättigt (200 µl/Kavität, 30 min). Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung und Ausschlagen der Platten wurden Serienverdünnungen (mindestens 1:100 in PBS, sowie jeweils drei bis sieben weitere 1:3-Verdünnungen) der zu überprüfenden Antiseren im Doppelansatz pipettiert (100 µl/Kavität). Nach einstündiger Inkubation unter leichter Bewegung (Taumler) in einer wasserdampfgesättigten Kammer erfolgten ein erneuter Waschschriff und die Zugabe von Enzymkonjugat-Lösung (Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, 1:100, 100 µl/Kavität). Nach 1 h Inkubation wurde die Platte erneut gewaschen und anschließend Enzymsubstrat-Chromogenlösung zupipettiert (100 µl/Kavität). Die Farbreaktion wurde nach 10 min durch Zugabe von 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen. Als Titer wurde die Serumverdünnung definiert, die unter diesen Reaktionsbedingungen einen Extinktionswert von 0,3 Einheiten ergab.

3.2.2.4 Auswahl geeigneter Antiseren durch parallele kompetitive Titration (Hemmtitration)

Die Eigenschaften der Antiseren der vier immunisierten Tiere aus einem Zeitraum von rund einem Jahr wurde in einem modifizierten indirekten ELISA getestet. In diesem Testaufbau können die absoluten Extinktionswerte verschiedener Antiserum-Konjugat-Kombinationen mit bzw. ohne Antigenzusatz vergleichend ermittelt werden und somit die optimale Konzentration der Immunreagenzien bestimmt werden.

Hierzu wurde je eine Mikrotiterplatte mit Cefquinom-CD-GOx-Konjugat bzw. mit Cefquinom-GA-BSA-Konjugat mit einer Konzentration von jeweils 2,5 µg/ml in PBS beschichtet (100µl/Kavität). Dieser parallele Ansatz zweier Festphasen ergab sich aus der unterschiedlich starken Reaktion der Seren verschiedener Tiere mit diesen zwei

Konjugaten. Die Platten wurden 24 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ausschlagen der Platten wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 2%igem Casein/PBS 30 min abgesättigt (200 µl/Kavität). Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung und Ausschlagen der Platten wurde in eine (positive) Hälfte der Platte Cefquinom-Lösung (in PBS, 100 ng/ml; 50 µl pro Kavität) pipettiert, in die andere (negative) Hälfte nur PBS (50 µl/Kavität). In jeder Hälfte der Platte wurde nun ein zu testendes Antiserum in verschiedener Verdünnungen (Anfangsverdünnung 1:100 in PBS, 1:3 weiterverdünnt) pipettiert (50 µl/Kavität). Nach einstündiger Inkubation auf dem Taumler in einer feuchten Kammer erfolgten ein erneuter Waschschrift und die Zugabe von Enzymkonjugat (Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, 1:100, 100 µl/Kavität). Nach einer letzten einstündigen Inkubation und einem weiterem Waschschrift wurde Substratlösung (100 µl/Kavität) auf die Platten pipettiert und nach 10 min die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt. Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen. Alle Antiseren von K17 und K20, die im Hinblick auf die Parameter 1) möglichst hohe einsetzbare Serumsverdünnung bei ausreichend hohen Extinktionswerten (ca. 1 Einheiten) für den Cefquinom-freien Ansatz sowie 2) möglichst vollständige kompetitive Reduktion der Extinktion im Cefquinom-haltigen Ansatz vergleichbare Ergebnisse erbrachten, wurden gepoolt. Für alle weiteren Versuche mit Antiserum von K17 bzw. K20 wurden jeweils diese Serum-Pools verwendet. Für die Antiseren der zwei anderen Kaninchen wurde, soweit nicht anders angegeben, jeweils das Antiserum der Blutentnahme aus der 39. Immunisierungswoche verwendet.

3.2.3 *Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntests (Doppelantikörpertechnik)*

Bei dieser Methode, die einerseits zur raschen Überprüfung verschiedener Testaufbauten für niedermolekulare Verbindungen geeignet ist und andererseits oft hohe Antiserum-Verdünnungen zulässt (MÄRTLBAUER et al., 1992), wurden die Kavitäten von Mikrotiterplatten mit einem gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper beschichtet (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG). An diese Festphase wurden in einem nächsten Schritt die spezifischen Anti-Cefquinom-Antikörper gebunden. Um deren Bindungsstellen wiederum konkurrieren in diesem Versuchsansatz freies und enzymmarkiertes Cefquinom (Cefquinom-HRP). Ungebundene Reagenten werden durch Waschschriffe vor dem Zusatz

von Enzymsubstrat entfernt. Das Antiserum wurde vor dem Einsatz nicht weiter aufbereitet.

3.2.3.1 Durchführung

Mikrotiterplatten wurden mit einem gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper beschichtet (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer, 200 µl/Kavität). Nach einer Inkubation von 24 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur wurden die Platten mit 2% Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 min abgesättigt, gewaschen und ausgeschlagen. Anschließend wurde Cefquinom-Standardlösung (in PBS, 35 µl/Kavität), Antiserum (in PBS, 35 µl/Kavität) und das jeweilige Cefquinom-HRP-Konjugat (in PBS, 35 µl/Kavität) in dieser Reihenfolge pipettiert. Nach 2 h Inkubation (Taumler) und einem Waschschrift wurde Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität) zugegeben und nach etwa 15 min die Reaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels RIDAWIN-Software. Der Extinktionswert des Cefquinom-freien Ansatzes („Leerwert“, „Blank“, B_0) wurde gleich 100% gesetzt und die den jeweiligen Cefquinomkonzentrationen entsprechenden (niedrigeren) Extinktionswerte (B) als Prozentwerte des „Leerwertes“ ($B/B_0 \times 100$) ausgedrückt.

3.2.3.2 Optimierung der Nachweisempfindlichkeit

Zur Optimierung der Nachweisempfindlichkeit wurden die verschiedenen Cefquinom-HRP-Konjugate sowie das Antiserum in verschiedenen Konzentrationen kombiniert und mittels Hemmtitration getestet. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Ziege-Anti-Kaninchen-IgG in einer Konzentration von 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/Kavität). Nach 24 h Inkubation in einer feuchten Kammer wurden die Platten ausgeschlagen und mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 min lang abgesättigt. Anschließend wurde auf eine Hälfte der Platten PBS (35 µl/Kavität), auf die andere Cefquinomstandardlösung (1 µg/ml; 35 µl/Kavität) pipettiert (Abbildung 9). Dann wurden Antiseren (verschiedene Verdünnungsstufen, in PBS) und jeweils eines der in Tabelle 5 genannten Cefquinom-Enzym-Konjugaten (in 1% Casein/PBS) zugegeben (je 35 µl/Kavität). Nach 2 h Inkubation

auf dem Taumler und einem Waschschrift wurde Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität) zugegeben und nach etwa 15 min die Reaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und wie in 3.2.3.1 ausgewertet. Für die weiteren Versuche wurde die Kombination der höchsten Enzymkonjugat- und Antiserumverdünnungsstufe gewählt, bei der die Extinktion der Negativkontrolle ca. 1,0 Einheiten betrug und die Inhibition der Farbreaktion durch das Antibiotikum relativ am stärksten war.

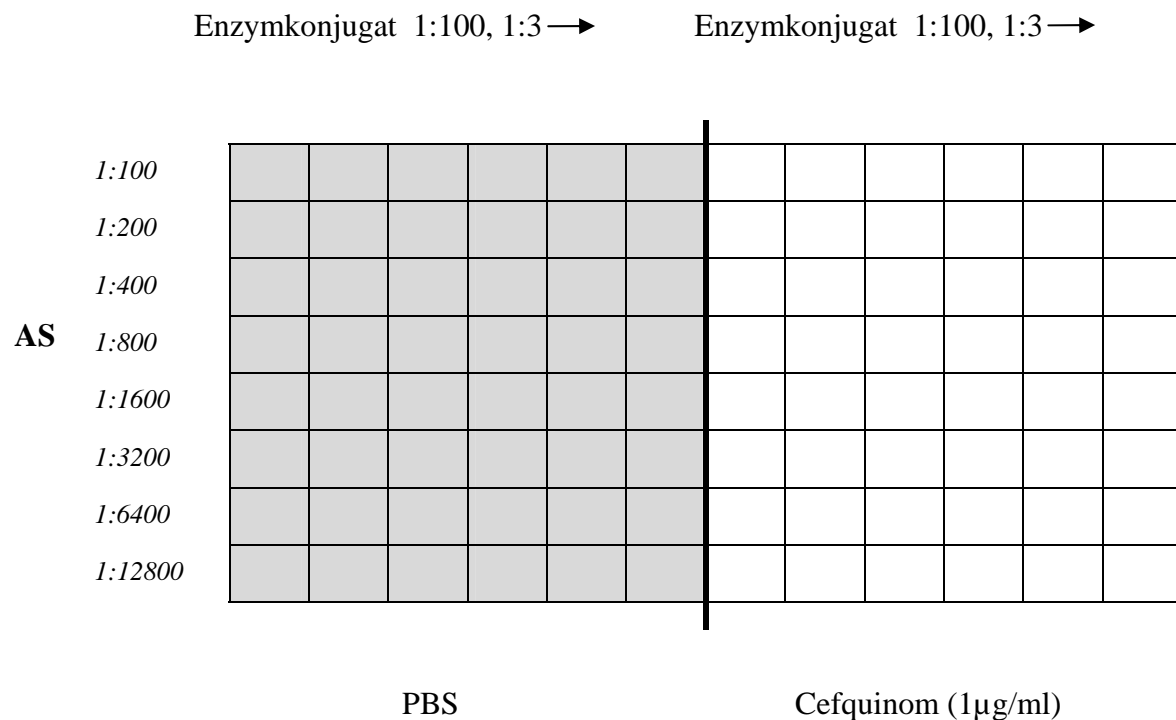


Abbildung 9: Beispiel für die Plattenbelegung zur Durchführung der Hemmtitration zur Ermittlung der optimalen Konzentration der Immunreagenzien für Cefquinom.

Tabelle 5: Verdünnung der Immunreagenzien für kompetitive direkte Enzymimmuntests unter Verwendung von Cefquinom-HRP-Konjugaten

Enzymkonjugat	Eingesetzte Verdünnung	Verdünnung des Anti-Cefquinom-Antiserums
Cefquinom-GA-HRP	1:100	1:1000-1:27000
Cefquinom-CD-HRP	1:100	1:10-1:2187
Cefquinom-PJ-HRP	1:100	1:30-1:90
Cefquinom-BQ-HRP	1:100	1:1000-1:27000

3.2.3.3 Ermittlung der Standardkurvenparameter

Unter den nach 3.2.3.2 optimierten Bedingungen des kompetitiven direkten Enzymimmuntests wurden Standardkurven für Cefquinom im Konzentrationsbereich von 0,3 - 1000 ng/ml erstellt. Die Platten wurden wie in 3.2.3.1 beschrieben ausgewertet. Als Maß für den Vergleich der verschiedenen Standardkurven wurde jeweils die 50%-Inhibitionsdosis (Cefquinomkonzentration, die 50% der Extinktion des Leerwertes ergab), sowie die Nachweisgrenze, definiert als diejenige Cefquinomkonzentration, die 70% des Extinktionswertes des Leerwertes ergab, ermittelt.

3.2.4 *Entwicklung eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests*

Im kompetitiven indirekten System wurden Mikrotiterplatten mit Cefquinom-Protein-Konjugaten als Festphase beschichtet. Bei diesem Testaufbau konkurriert das Beschichtungsantigen nach Zugabe von Anti-Cefquinom-Antiserum und Cefquinom-Standardlösung mit dem freien Antibiotikum um die Antikörper-Bindungsstellen. Ungebundene Reagenzien werden dann durch Waschen und Ausschlagen der Platten entfernt. An die Festphasen-gebundenen Antikörper binden in einem zweiten

Reaktionsschritt gegen Kaninchen-IgG gerichtete, enzymmarkierte Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-HRP).

3.2.4.1 Durchführung

Für den kompetitiven indirekten Enzymimmuntest wurden Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen Cefquinom-Protein-Konjugat (Tabelle 6) in verschiedenen Verdünnungsstufen in PBS beschichtet. Nach einer Inkubation von 24 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Platten bei 4-6 °C im Kühlschrank gelagert. Vor der eigentlichen Testdurchführung wurden die Platten 30 min mit 2% Casein/PBS abgesättigt, anschließend gewaschen und die Restfeuchtigkeit ausgeklopft.

Zur Testdurchführung wurde zunächst Cefquinom-Standardlösung bzw. Probenlösung zupipettiert (50 µl/Kavität). Für die Untersuchung von pasteurisierter Konsummilch wurden die Standardlösungen in 5% Magermilchpulver/PBS angesetzt. Für die Untersuchung von Rohmilch wurden die Standardlösungen in 10% Magermilchpulver/PBS angesetzt. Die Milchproben wurden jeweils in PBS verdünnt. Anschließend wurde Anti-Cefquinom-Antiserum (50 µl/Kavität) pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 h wurden die Platten dreimal mit Waschlösung gewaschen, ausgeschlagen und der Sekundärantikörper (Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP; 1:1000 verdünnt in 1% Casein/PBS, 100 µl/Kavität) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 1 h und einem weiteren Waschzyklus wurde Enzymsubstrat-Chromogenlösung zugegeben (100 µl/Kavität). Die Farbreaktion wurde nach 10-20 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt und die Extinktion bei 450 nm, wie bei 3.2.3.1 beschrieben, gemessen und ausgewertet.

3.2.4.2 Optimierung der Nachweisempfindlichkeit

Zur Optimierung der Nachweisempfindlichkeit wurde analog wie in Kapitel 3.2.3.2 verfahren und die verschiedenen Cefquinom-Protein-Konjugate (Tabelle 7) sowie das Antiserum in verschiedenen Konzentrationen kombiniert und mittels Hemmtitration getestet. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Cefquinom-Protein-Konjugate im Doppelansatz beschichtet (Abbildung 9). Hierzu wurde

das jeweilige Beschichtungskonjugat in PBS verdünnt und auf jede Hälfte der Platte pipettiert (100 µl/Kavität). Nach einer Inkubation von 24 h wurden die Platten ausgeschlagen und mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 min lang abgesättigt und gewaschen. Für die Hemmtitration wurde in eine Hälfte der Kavitäten PBS (50 µl/Kavität), in die korrespondierende andere Hälfte Cefquinomstandardlösung (10 ng/ml; 50 µl/Kavität) pipettiert. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungsstufen der Anti-Cefquinom-Antiseren zupipettiert (50 µl/Kavität) und 1 h inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde der Sekundärantikörper (Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, 1:1000 verdünnt in 1% Casein/PBS; 100 µl/Kavität) zugegeben und erneut 1 h inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität) zugegeben und nach 15 min die Reaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Die Extinktion bei 450 nm wurde gemessen und die Ergebnisse wie in 3.2.3.1 beschrieben ausgewertet. Für die weiteren Versuche wurde diejenige Kombination der Immunreagenzien gewählt, die bei möglichst hohen Verdünnungen noch zu Extinktionswerten für die Negativkontrolle von mindestens 1,0 Einheiten führte und gleichzeitig in einer maximalen Hemmung der Farbreaktion durch freies Cefquinom resultierte.

Tabelle 6: Eingesetzte Cefquinom-Proteinkonjugate im kompetitiven indirekten Enzymimmunttest und getestete Verdünnungsstufen der Immunreagenzien

Konjugat		Antiserum, Verdünnung
Bezeichnung	Getestete Verdünnungen	
Cefquinom-GA-BSA	1:680-1:11334	1:10-1:21870
Cefquinom-CDI-BSA	1:870-1:8700	1:100-1:12800
Cefquinom-CD-BSA	1:650-1:6500	1:100-1:12800
Cefquinom-CD-GOx	1:1520-1:15200	1:100-1:12800

3.2.4.3 Ermittlung der Standardkurvenparameter

Unter den nach 3.2.4.2 optimierten Bedingungen des indirekten ELISA wurden Standardkurven für Cefquinom in Konzentrationen von 0,1 bis 100 ng/ml erstellt. Als Maß für den Vergleich der Standardkurven wurden die 50%-Dosis (Cefquinomkonzentration, die 50% der Extinktion des Leerwertes ergab) und die 70%-Dosis (Cefquinomkonzentration, die 50% der Extinktion des Leerwertes ergab) herangezogen.

3.2.4.4 Ermittlung der Spezifität der Enzymimmuntests

Die Ermittlung der Spezifität der Enzymimmuntests unter Verwendung der Antiseren K17 bzw. K20 erfolgte durch Wettbewerbsversuche mit den in Tabelle 7 aufgeführten β -Laktamantibiotika (gelöst in PBS) in einer Konzentration von jeweils 1 μ g/ml PBS unter Verwendung des nachfolgend beschriebenen kompetitiven indirekten Testsystems:

Tabelle 7: Zur Ermittlung der Testspezifität des Enzymimmuntests für Cefquinom überprüfte β -Laktamantibiotika

Cephalosporine mit MRL	Cephalosporine ohne MRL	Penicilline
Cefacetril	Cefaclor	Amoxicillin
Cefalexin	Cefadroxil	Ampicillin
Cefalonium	Cefmandol	Coxacillin
Cefapirin	Cefmetazol	Dicloxacillin
Cefazolin	Cefotaxim	Nafcillin
Cefoperazon	Cefoxitin	Oxacillin
Ceftiofur	Cefsulodin	Penicillin G
	Ceftriaxon	Hydrolysiertes Penicillin G
	Cefuroxim	
	Cephadrin	

Mikrotiterplatten wurden zunächst mit Cefquinom-CD-GOx-Konjugat in einer Konzentration von ca. 2,5 µg/ml (verdünnt in PBS) beschichtet (100 µl/Kavität). Die Platten wurden 24 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ausschlagen der Platten wurden diese mit 2%igem Casein/PBS abgesättigt und eine halbe Stunde inkubiert (200 µl/Kavität). Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung und Ausschlagen der Platten wurden die entsprechenden Antibiotika in einer Konzentration von 1 µg/ml PBS pipettiert (50 µl/Kavität). Anschließend wurden die Antiseren von Kaninchen 17 bzw. 20 jeweils 1:200 (in PBS) zupipettiert (50 µl/Kavität). Nach 1 h Inkubation wurde die Platte gewaschen und der Sekundärantikörper (Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, 1:800 in 1% Casein/PBS, 100 µl/Kavität) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1 h und einem Waschschrift erfolgte die Zugabe von Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität), die Farbreaktion wurde nach 10 min mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Eine Cefquinom-Standardkurve in PBS wurde als Referenz auf jeder Mikrotiterplatte mituntersucht. Als kompetitive Hemmung durch andere Antibiotika wurde ein Extinktionswert bei einer Konzentration von 1 µg/ml von <90% des Leerwerts gewertet.

3.2.5 *Versuche zur Anwendbarkeit des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests*

Mit dem optimierten immunchemischen Testsystem, dem kompetitiven indirekten Enzymimmuntest unter Verwendung des Antiserum-Pools K17 (eingesetzte Verdünnung 1:300) und des Cefquinom-CD-GOx-Beschichtungsantigens (Verdünnung zur Beschichtung: 1:600), wurden Versuche zum Nachweis von Cefquinom in Rohmilch sowie in Konsummilch (pasteurisiert und homogenisiert, 3,5% Fettgehalt) durchgeführt. Rohmilch von nicht mit Antibiotika behandelten Kühen wurde aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer der Justus-Liebig-Universität Gießen (Prof. Dr. K. Doll, Frankfurter Straße 110, 35392 Gießen) erhalten. Diese Rohmilch wurde ohne weitere Aufarbeitung portioniert und bei -80 °C eingefroren. Für die Testdurchführung wurden jeweils Portionen dieser Rohmilch langsam im Wasserbad aufgetaut. Pasteurisierte Vollmilch wurde aus dem Lebensmitteleinzelhandel bezogen.

Milchproben wurden mit Cefquinomstandardlösung jeweils in Konzentrationen im Bereich des MRL für Cefquinom (10, 20 bzw. 40 ng/ml) dotiert. Die Proben wurden durch Zentrifugieren (15 min bei 1942 x g und 4 °C) entfettet und direkt im Test untersucht bzw. mit Magermilchpulverlösung (5% in PBS für Vollmilchproben bzw. 10 % in PBS für Rohmilchproben) verdünnt.

Typischerweise wurde jeweils die unverdünnte Magermilch sowie eine 1:2, 1:4 und 1:8 verdünnte Probe gleichzeitig untersucht. Alle Standard- und Probenlösungen wurden im Vierfachansatz untersucht. Für die Auswertung wurden die Mittelwerte der Meßwerte aller Verdünnungsstufen verwendet, die in Extinktionswerten von >20% aber <70% des Cefquinom-freien Leerwerts resultierten. Die Testdurchführung erfolgte wie in 3.2.4.1 beschrieben.

4 ERGEBNISSE

4.1 Herstellung der Immunreagenzien

Da bisher noch keine Ansätze zur Herstellung von Cefquinom-Proteinkonjugaten beschrieben worden waren, wurden verschiedene in der Literatur für andere Haptene mit ähnlichen Strukturmerkmalen beschriebene Kopplungsreaktionen getestet. Eine qualitative spektrophotometrische Überprüfung der hergestellten Cefquinom-Protein- bzw. Cefquinom-Enzymkonjugate zeigte, dass in allen Konjugaten das Absorptionsmaximum von Cefquinom (Abbildung 10) bei 265 nm erkennbar war. Dies belegte qualitativ den Erfolg der eingesetzten Synthesereaktionen. Aufgrund von starken Überlagerungen des typischen Absorptionsmaximums der verwendeten Reinproteine im Wellenlängenbereich zwischen 260 nm und 280 nm war eine quantitative Bestimmung des in den Konjugaten kovalent gebundenen Cefquinoms jedoch nicht möglich. Besonders starke Überlagerungen durch Eigenabsorption der Trägerproteine wurden für Cefquinom-GA-KLH sowie für Cefquinom-CD-GOx festgestellt. Weiterhin konnte aufgrund der Synthesereaktionen keine sichere Aussage über mögliche Nebenreaktionen der Kopplungsreaktionen im Hinblick auf eine hydrolytische Spaltung des β -Laktamrings getroffen werden. In den Abbildungen 11 und 12 sind beispielhaft die UV-Spektren für Cefquinom-GA-HRP und Cefquinom-CD-BSA sowie die korrespondierenden Spektren der Reinproteine und die resultierenden Differenzspektren dargestellt.

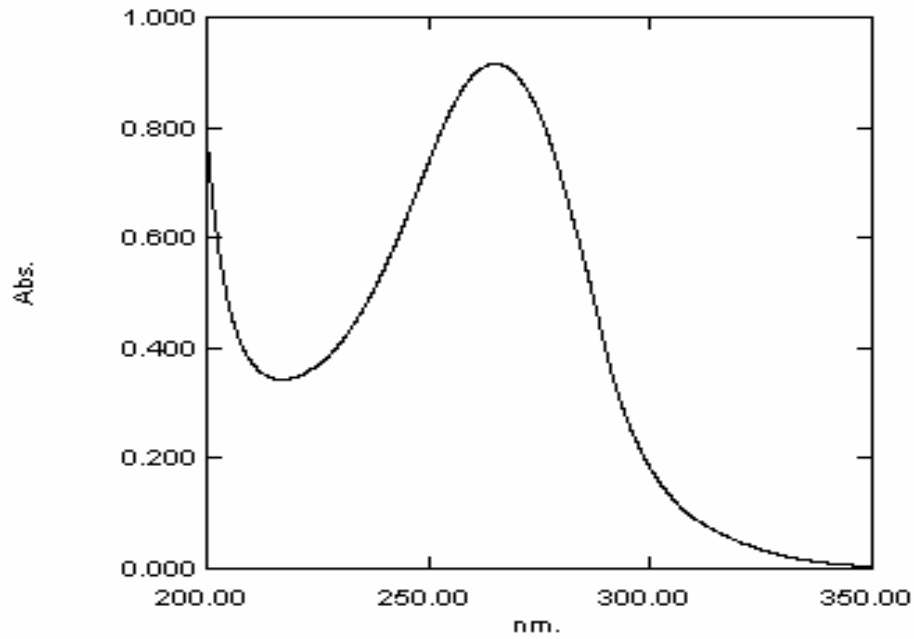


Abbildung 10: Typisches UV-Absorptionsspektrum von Cefquinom in A. dest (10 µg/ml).

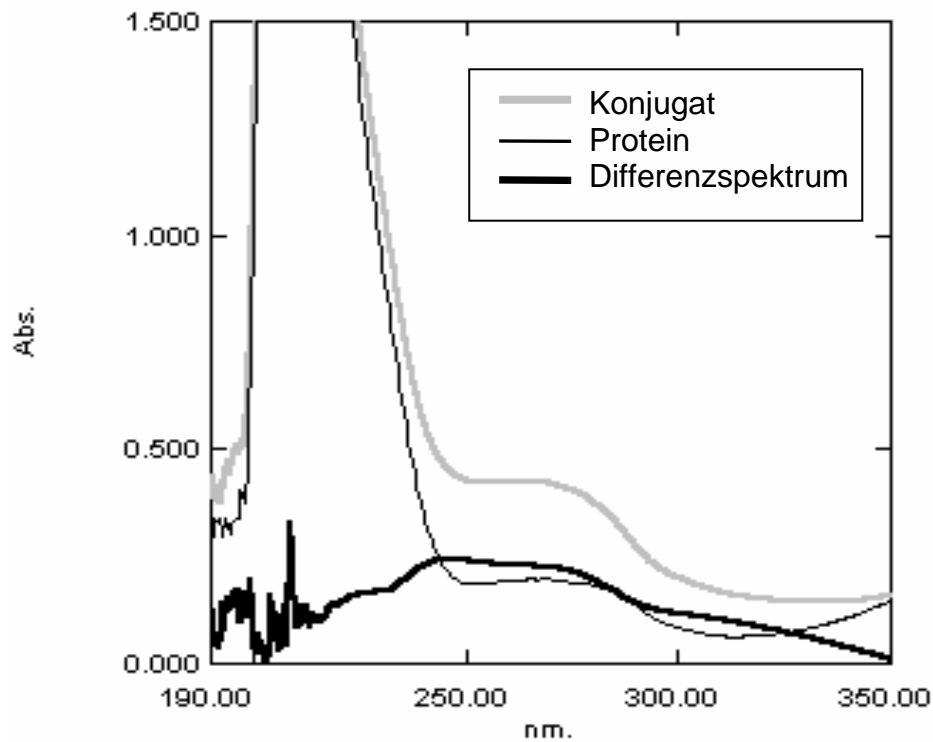


Abbildung 11: Vergleich der UV-Spektren für Cefquinom-GA-HRP (1:10 in PBS) und HRP-Reinprotein-Lösung (125 µg/ml in PBS) sowie resultierendes Differenzspektrum.

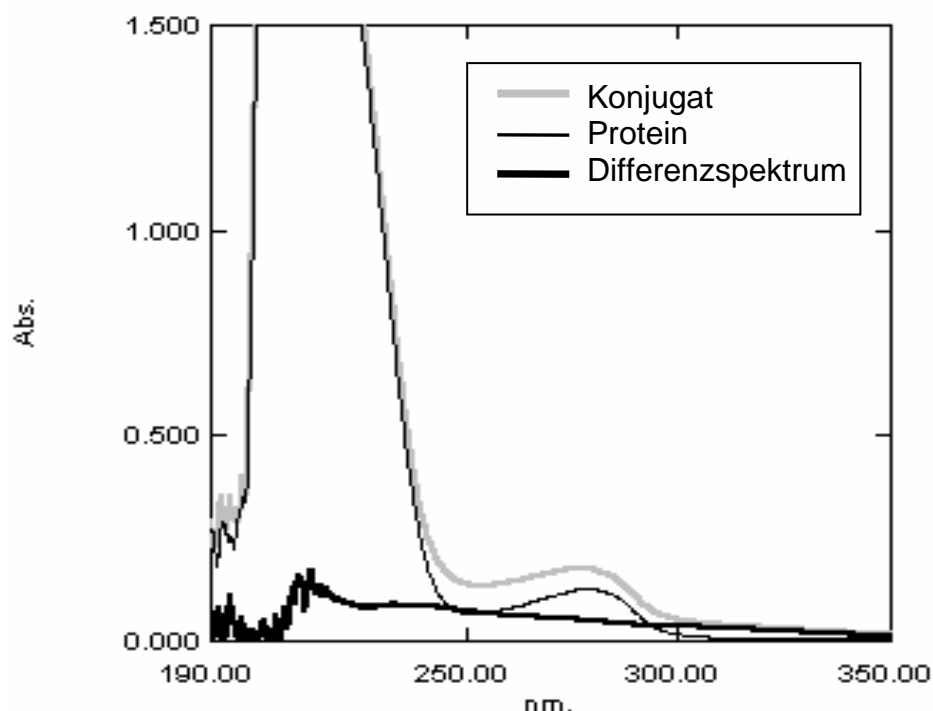


Abbildung 12: Vergleich der UV-Spektren für Cefquinom-CD-BSA (1:70 in PBS) und BSA-Reinprotein-Lösung (200 µg/ml in PBS) sowie resultierendes Differenzspektrum.

4.2 Gewinnung spezifischer Antisera gegen Cefquinom

4.2.1 Antikörper-Titerverlauf

Die Überprüfung des spezifischen Antikörpertiters gegen Cefquinom erfolgte während des gesamten Immunisierungsverlaufs kontinuierlich unter Verwendung von Cefquinom-Protein-Konjugaten als Beschichtungsantigen, nach Abschluss der Immunisierung zusätzlich noch einmal retrospektiv.

Alle immunisierten Tiere entwickelten meßbare Antikörpertiter ($>0,3$ Extinktionseinheiten bei Antiserumverdünnung $\geq 1:100$), allerdings mit deutlichen individuellen Unterschieden bezüglich Titerhöhe (Abbildung 13). Nach der Grundimmunisierung stieg der Titer bei allen Kaninchen langsam auf niedrige Werte um 1:500 an. Etwa vier Wochen nach der ersten Restimulierung in der 12. Woche stieg der Titer von Kaninchen 17 deutlich an, um nach der 2. Restimulierung in der 19. Woche zunächst wieder abzufallen. Nach der 3.

Restimulierung in der 37. Woche erreichte der Titer sein Maximum und fiel danach langsam, aber kontinuierlich ab. Die festgestellten Serumtiter für K18 erreichten ein kurzzeitiges Maximum ca. acht Wochen nach der 2. Restimulierung, bei insgesamt durchgehend relativ niedrigen Antiserum-Titern. Der Titer bei K19 stieg jeweils direkt nach den Restimulierungen kurzzeitig an, gefolgt von einem langsamen Abfall. Die maximale Titerhöhe wurde ebenfalls erst nach der 3. Restimulierung erreicht. Bei K20 fiel der Titer nach der ersten Restimulierung kurzzeitig ab, stieg jedoch anschließend sprunghaft an. Nach der 2. Restimulierung wurde ein weiterer kontinuierlicher Anstieg verzeichnet bis zum Maximum nach der 3. Restimulierung. Insgesamt erreichte K20 unter den gewählten Testbedingungen den höchsten relativen Antiserum-Titer ($>1:50000$).

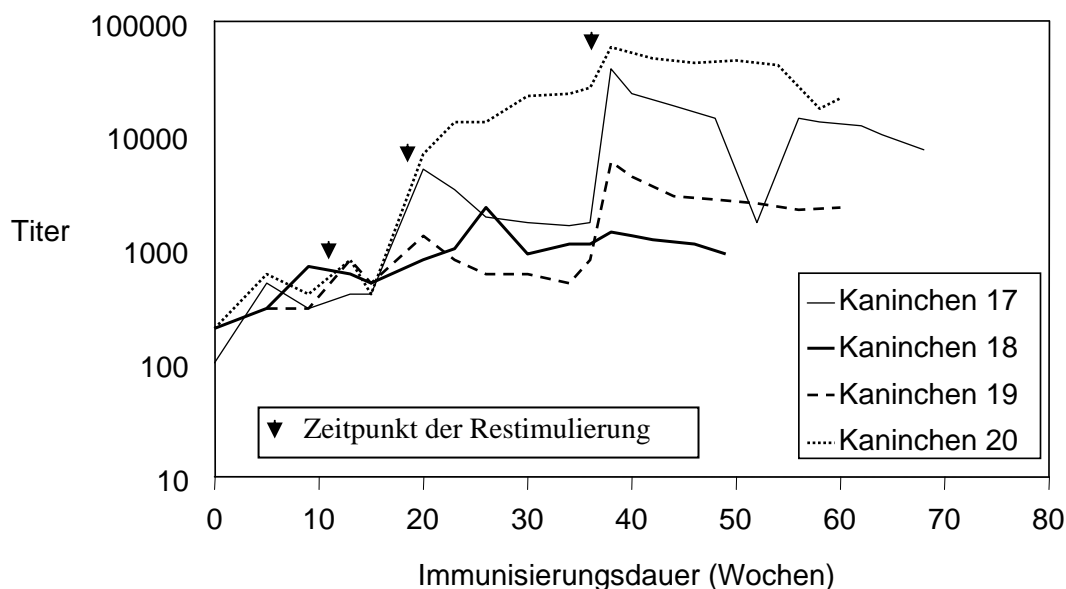


Abbildung 13: Relative Antiserumtiter der mit Cefquinom-KLH immunisierten Kaninchen nach Überprüfung im kompetiven indirekten Testsystem unter Verwendung von Cefquinom-CD-GOx als Festphasenantigen.

4.3 Auswahl geeigneter Antiseren

Entsprechend den in 3.2.4.2 und 3.2.4.3 genannten Kriterien erwiesen sich bei Verwendung von Cefquinom-CD-GOx-Konjugat bzw. Cefquinom-GA-BSA-Konjugat als

Festphasenantigen die Anti-Cefquinom-Antiseren der Immunisierungswochen 20-48 von Kaninchen 17 als am besten geeignet, da hier bei ausreichender Absorption für den Negativkontrollansatz (Leerwert) maximale Inhibition durch freies Cefquinom erzielt werden konnten.

Unter Verwendung der Antiseren der Immunisierungswochen 20-48 von K20 konnte ebenfalls jeweils eine Extinktion von ca. 1,0 des antigenfreien Ansatzes erzielt werden, allerdings lagen die Extinktionswerte der korrespondierenden Cefquinom-haltigen Ansätze deutlich höher als bei Verwendung der Seren von K17, d.h. die spezifische kompetitive Inhibition war geringer ausgeprägt.

Die Antiseren der Immunisierungswochen 20-48 von K17 bzw. K20 wurden daher zur Durchführung weiterer Versuche jeweils individuell gepoolt. Für die Etablierung eines praktikablen Testsystems erwies sich im Hinblick auf einen Cefquinom-Nachweis in Milch auf MRL-Niveau lediglich der Serum-Pool von K17 geeignet.

Mit Antiseren K18 und K19 konnte selbst durch hohe Konzentrationen von Cefquinom-Standardlösung (1 µg/ml) jeweils nur eine schwache kompetitive Inhibition von maximal ca. 60% bzw. 78% des Leerwertes erzielt werden. Zudem waren für diese Antiseren in keiner Kombination mit markiertem Antigen ausreichend hohe Extinktionen für den antigenfreien Ansatz erreichbar. Die Seren von K18 und K19 wurden daher nicht gepoolt, sondern für die weiteren Vergleichsuntersuchungen lediglich die Seren der Woche 39 nach Grundimmunisierung verwendet, da diese zu den relativ besten Ergebnissen führten.

4.4 Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntests (Doppelantikörpertechnik)

4.4.1 Überprüfung und Optimierung der Nachweisempfindlichkeit

Von den vier hergestellten Cefquinom-HRP-Konjugaten wurden lediglich für das Cefquinom-BQ-HRP ausreichend hohe Absorptionswerte des Leerwerts bei gleichzeitiger kompetitiver Inhibition durch freies Cefquinom festgestellt. Für Cefquinom-PJ-HRP, Cefquinom-GA-HRP und Cefquinom-CD-HRP wurden auch bei Einsatz hoher

Konzentrationen der Immunreagenzien keine ausreichende Absorption und allenfalls minimale kompetitive Inhibition festgestellt.

Praktikable Resultate im Hinblick auf Meßwerte bezüglich der in 3.2.3.1 und 3.2.3.2 genannten Kriterien konnten lediglich für den kompetitiven direkten Testaufbau des Enzymimmuntests unter Verwendung von Antiserum von K17 (eingesetzte Verdünnung 1:1000) und in Kombination mit Cefquinom-BQ-HRP (Verdünnung 1:100) erzielt werden.

Bei Verwendung des Antiserums K20 und Cefquinom-BQ-HRP wurden zwar ebenfalls Extinktionen für den antigenfreien Ansatzes von ca. 1,0 Einheiten erreicht, allerdings ließ sich die Bindung des Cefquinom-Benzozquinon-HRP durch freies Cefquinom auch in hohen Konzentrationen (bis 10 µg/ml) nicht inhibieren. Mit den Antiseren K18 bzw. K19 konnten in keiner Kombination mit den verschiedenen Enzymkonjugaten ausreichend hohe Extinktionen des antigenfreien Ansatzes erzielt werden, die Maximalwerte lagen die Höchstwerte bei <0,3 Einheiten.

Mit den nach 4.4.1 optimierten Kombinationen von Immunreagenzien (Antiserum-Pool K17; Cefquinom-BQ-HRP) wurden Standardkurven für Cefquinom erstellt. Die Extinktionen der Leerwerte lagen bei 0,4 bis 1,0 Einheiten, die maximale durch Cefquinom (1 µg/ml PBS) erzielbare Inhibition resultierte in Extinktionswerte von ca. 0,2 Einheiten. Im ausgewerteten Bereich zwischen 30% und 70% relativer Extinktion lagen die Variationskoeffizienten unter 10%. Die Nachweisgrenze (70%-Wert) der Tests lag bei 16-32 ng/ml, die 50%-Dosis bei 32-55 ng/ml (Abbildung 14).

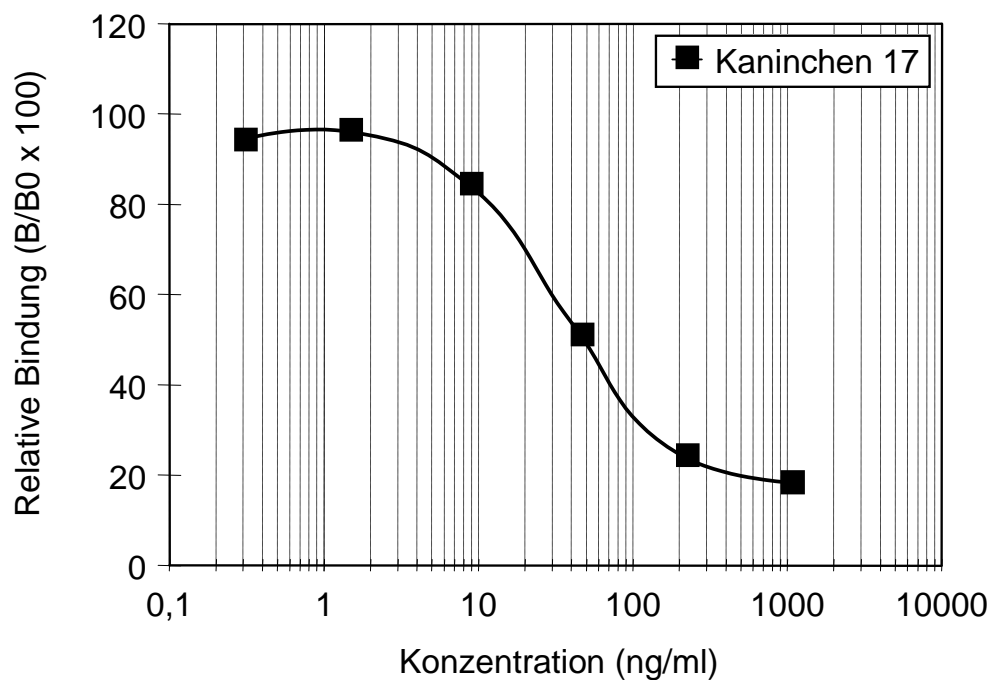


Abbildung 14: Typische Standardkurve des kompetitiven direkten Enzymimmuntests für Cefquinom unter Verwendung von Antiserum K17 (1:500 Verdünnung in PBS) und Cefquinom-BQ-HRP-Konjugat (1:100 Verdünnung in 1% Casein/PBS). Die Intra-assay Standardabweichungen für Replikate der einzelnen Standardkonzentrationen ($n=4$) lagen unter 10%, die 50%-Dosis lag bei 50 ng/ml. Die Nachweisgrenze lag bei 20 ng/ml. Die Extinktion des Leerwertes betrug 1,0 Einheiten, die höchste Cefquinomkonzentration (1 $\mu\text{g/ml}$) führte zu einem Extinktionswert von 0,18 Einheiten.

Aufgrund der ermittelten Testsensitivität war das kompetitive direkte Testsystem auch nach Optimierung nicht für einen Nachweis von Cefquinom in Milch im Bereich des MRL (20 $\mu\text{g/kg}$) geeignet und wurde daher nicht weiter untersucht.

4.5 Entwicklung eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests

4.5.1 Testsensitivität

Bei Verwendung von Cefquinom-CDI-BSA (getestete Verdünnungen 1:870-1:8700) bzw. Cefquinom-CD-BSA (getestete Verdünnungen 1:650-1:6500) konnten mit keinem der hergestellten Antiseren (getestete Verdünnungen 1:100-1:12800) befriedigende Ergebnisse im Hinblick auf die in 3.2.4.1 und 3.2.4.2 genannten Kriterien (Tabelle 5, 3.2.4.2) erreicht werden. Zwar konnten bei niedrigen Verdünnungen der Immunreagenzien Extinktionswerte für den antigenfreien Ansatz von bis zu 0,8 Einheiten erreicht werden, wobei jedoch keine spezifische kompetitive Inhibition durch Cefquinom-Standardlösungen (bis 10 µg/ml PBS) beobachtet wurde. Geringgradige Reduktionen des Meßsignals auf höchstens 80-90 % des Leerwertes wurden als unspezifische Reaktion gewertet.

Im Hinblick auf die Testsensitivität ergaben Kombinationen aus Antiserum-Pool K17 und sowohl Cefquinom-GA-BSA als auch Cefquinom-CD-GOx als Beschichtungsantigen grundsätzlich brauchbare Ergebnisse (Abbildung 15). Hier wurden bei Extinktionswerten für den Cefquinomfreien Leerwert von ca. 1,0 Einheiten eine praktisch vollständige kompetitive Inhibition durch Cefquinom-Standardlösungen (je nach Testkombination bei 100-1000 ng/ml) bis unter 10% des Leerwertes erzielt werden (Abbildung 16).

Die 50%-Dosen lag bei Verwendung von Cefquinom-GA-BSA als Beschichtungsantigen allerdings bei rund 10 ng/ml und damit bereits der Hälfte des MRL-Wertes. Aufgrund des daraus resultierenden, wenn auch geringen, Abstands zwischen Anforderung und erreichbarer Testsensitivität wurde dieser Testaufbau nicht weiter verfolgt.

Unter Verwendung Antiserum von K17 und Cefquinom-CD-GOx als Beschichtungsantigen (1:3040) konnte eine optimale Testsensitivität erreicht werden (Tabelle 8). Zudem wiesen die Meßergebnisse bei Verwendung dieses Beschichtungsantigens die höchste Reproduzierbarkeit auf (Intraassay-Variationskoeffizienten <10%; Interassay-Variationskoeffizienten bei 50% und 70% Inhibition <20%). Daher wurde diese Kombination der Immunreagenzien als Standard-Enzymimmuntest zur weiteren Bestimmung von Cefquinom in Milch etabliert.

Mit dem Antiserum K18 konnte dagegen für Cefquinom-Standardlösungen (1 µg/ml) und Cefquinom-GA-BSA als Beschichtungsantigen nur eine Reduzierung der Extinktion von maximal 40% des Leerwertes erreicht werden. Bei Verwendung der anderen Beschichtungskonjugate war die Inhibition durch freies Cefquinom minimal oder unspezifisch (ca. 80-90% des Leerwertes).

Für Antiserum K19 ergab sich ebenfalls in Kombination mit Cefquinom-GA-BSA als Beschichtungsantigen der relativ empfindlichste Testaufbau (Abbildung 15). Bei Extinktionswerten von 1,0 Einheiten für den Leerwert wurde durch hohe Konzentrationen von Cefquinom-Standardlösung (1 µg/ml) eine Inhibition auf 10-20% von derjenigen des Leerwertes erzielt. Unter Verwendung aller anderen Cefquinom-Protein-Konjugate konnten keine relevante und als spezifisch zu betrachtende Inhibition durch freies Cefquinom (1 µg/ml) erzielt werden.

Unter Verwendung des Antiserums-Pools von K20 konnten ebenfalls mit Cefquinom-GA-BSA als Beschichtungsantigen Standardkurven mit Extinktionswerten des Leerwertes von 1,0 Einheiten und einer maximaler Inhibition durch freies Cefquinom (200 ng/ml) auf 10-20% des Leerwertes erreicht werden (Abbildung 15). Die 50%-Dosis der Standardkurven lag in allen Fällen bei >8 ng/ml. Cefquinom-C-GOx als Beschichtungsantigen ergab mit Antiserum von Kaninchen 20 ebenfalls eine meßbare Dosis-Wirkungsbeziehung, allerdings auch hier bei relativ geringer Testsensitivität.

Die Standardkurven des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests für Cefquinom unter Verwendung des Antiserum-Pools K17 (Verdünnung 1:200) und Cefquinom-CD-GOx als Beschichtungsantigen (Verdünnung 1:3040) ergaben über einen Zeitraum von mehreren Monaten hinweg 50%-Inhibitionswerte für Cefquinom-Standardlösungen von 2,1-3,9 ng/ml, eine mittlere untere Nachweisgrenze von 1,4 ng/ml (Tabelle 8). Im Vergleich hierzu lag bei Verwendung von Cefquinom-GA-BSA die 50%-Dosis der Standardkurve bei über 10 ng/ml (Antiserum-Verdünnung 1:800).

Mit den Seren von Kaninchen 18 konnten keine auswertbaren Standardkurven erstellt werden.

Für die Antiseren K19 wurde die beste kompetitive Inhibition durch Cefquinom bei Verwendung des Serums der Woche 39 (1:400-1:800) in Kombination mit Cefquinom-GA-BSA (1:11334) ermittelt, die Standardkurve wies hier eine Nachweisgrenze von 25,7 ng/ml und eine 50%-Inhibitionsdosis von 51-55 ng/ml auf.

Die Standardkurven des kompetitiven indirekten Testsystems unter Verwendung des Antiserum-Pools K20 (Verdünnung 1:400-1:800) unterschieden sich geringfügig in Abhängigkeit vom eingesetztem Beschichtungsantigen. Bei Verwendung von Cefquinom-GA-BSA (Verdünnung 1:11334) lagen die Nachweisgrenzen der Standardkurven bei 3,1-6,0 ng/ml, die 50%-Dosen bei 8,6-11,5 ng/ml (Abbildung 15). Mit Cefquinom-CD-GOx-Konjugat (1:6080) wurde eine etwas geringere Testsensitivität festgestellt, die Nachweisgrenze lag im Mittel bei etwa 6 ng/ml, die 50%-Dosen im Bereich von 10 bis 21 ng/ml. Zudem wiesen die Meßwerte für Cefquinom-Standardkonzentrationen bei diesem Testaufbau höhere Variationskoeffizienten auf als bei Verwendung von Cefquinom-GA-BSA.

Tabelle 8: Referenzdaten der kompetitiven indirekten Enzymimmuntests für Cefquinom unter Verwendung optimierter Kombinationen aus Antiserum und Beschichtungsantigen

Kaninchen Nr	Antiserum Pool K17	Antiserum K19 (39. Woche)	Antiserum Pool K20
Antiserum, eingesetzte Verdünnungen	1:200	1:400-1:800	1:100-1:400
Beschichtungskonjugat	Cefquinom- CD-GOx	Cefquinom- GA-BSA	Cefquinom- GA-BSA
Beschichtungskonjugat, eingesetzte Verdünnung	1:3040	1:11334	1:11334
50%-Wert der Standardkurve (Bereich, min-max, ng/ml)	2,1-3,9	51,1-55	8,6-11,5
Mittelwert 50%-Wert (ng/ml)	2,8	52,7	10
Standardabweichung 50%-Dosis (ng/ml)	0,7	2	2,1
Variationskoeffizient 50%-Dosis (%)	24,4	3,9	21,4
Nachweisgrenze (70%-Wert) Standardkurve (ng/ml)	1-1,6	20-32	3,1-6
Mittelwert Nachweisgrenzen (ng/ml)	1,4	25,7	3,9
Standardabweichung Nachweisgrenze (ng/ml)	0,2	6	1,1
Variationskoeffizient Nachweisgrenze (%)	14,1	23,5	29,1
N	7	3	7

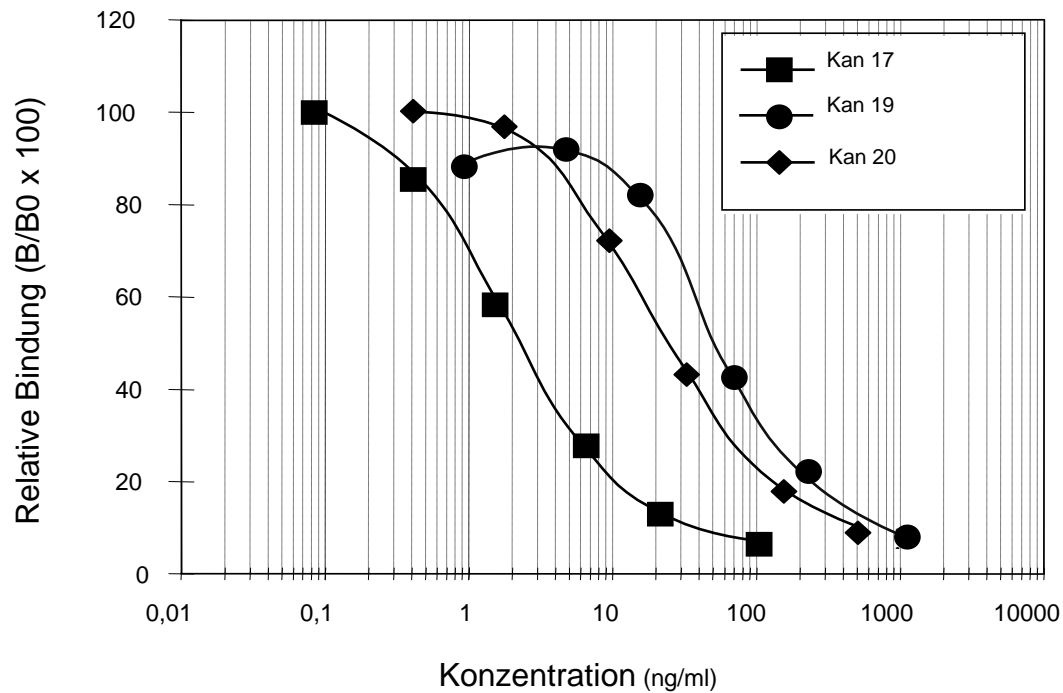


Abbildung 15: Vergleich der Standardkurven der kompetitiven indirekten Enzymimmuntests für Cefquinom unter Verwendung der Antiseren K17 (Pool), K19 (Woche 39) bzw. K20 (Pool) in der für jedes Antiserum optimierten Kombination (Tabelle 8) mit Beschichtungsantigen (Cefquinom-Protein-Konjugat). Die Absorptionswerte des Cefquinom-freien Leerwertes (B_0) lagen jeweils zwischen 0,8 und 1,0 Einheiten.

K17: Antiserum Verdünnung 1:300, Cefquinom-CD-GOx 1:3040

K19: Antiserum Verdünnung 1:400, Cefquinom-GA-BSA 1:11334

K20: Antiserum Verdünnung 1:200, Cefquinom-GA-BSA 1:11334

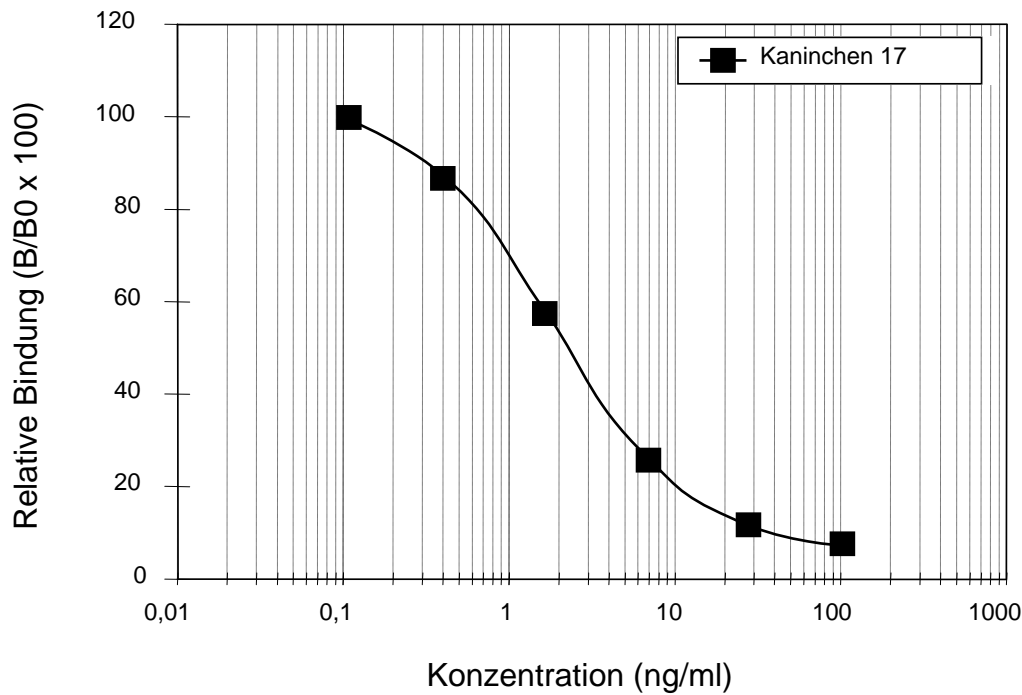


Abbildung 16: Charakteristische Standardkurve des optimierten kompetitiven indirekten Enzymimmuntests für Cefquinom (Antiserum K17 Pool, Cefquinom-CD-GOx). Die 50%-Dosis der Standardkurve beträgt 2,1 ng/ml, die Nachweisgrenze liegt bei 1 ng/ml. Die Absorptionswerte des Cefquinom-freien Leerwertes (B_0) Extinktionen lagen bei 1,0 Einheiten, die maximal erzielbare Inhibition durch Cefquinom (100 ng/ml) resultierte in 0,07 Extinktionseinheiten.

4.6 Ermittlung der Spezifität

Die Überprüfung der Spezifität der Enzymimmuntests unter Verwendung von Antiserum K17 bzw. K20 im kompetitiven indirekten Testsystem ergab, dass beide hochspezifisch für Cefquinom sind. Keines der 25 überprüften β -Laktamantibiotika (1 μ g/ml PBS) führte bei einer getesteten Konzentration von 1 μ g/ml zu einer kompetitiven Inhibition. K18 und K19 wurden aufgrund ihrer generell unzureichenden Testeigenschaften nicht geprüft.

4.7 Anwendbarkeit des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests zum Nachweis von Cefquinom in Milch

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests unter Verwendung von Antiserum K17 und Cefquinom-CD-GOx als Beschichtungsantigen wurde künstlich kontaminierte Rohmilch bzw. pasteurisierte Konsummilch (3,5% Fett) entfettet und ohne weitere Probenaufreinigung unverdünnt oder mit Magermilchpulver/PBS (5% für Rohmilch, 10% für Konsummilch) verdünnt im Testsystem eingesetzt. Durch Herstellung von Cefquinom-Standardkonzentrationen in Magermilchpulver/PBS konnten Probenmatrixeffekte weitgehend eliminiert werden, so dass bereits für (Cefquinom-freie) entfettete aber unverdünnte Milchproben mittlere Extinktionswerte entsprechend der Streubreite des Cefquinom-freien Puffer-Leerwertes gemessen wurden ($B/B_0 \times 100$: 83-101% für pasteurisierte Vollmilch; 86-113% für Rohmilch). Die Standardkurven für Cefquinom in 5% Magermilchpulver/PBS bzw. in 10% Magermilchpulver/PBS unterschieden sich in ihrem Verlauf nur geringfügig (Abbildung 17), kompensierten jedoch für Rohmilch bzw. pasteurisierte Vollmilch jeweils optimal die Matrixeffekte.

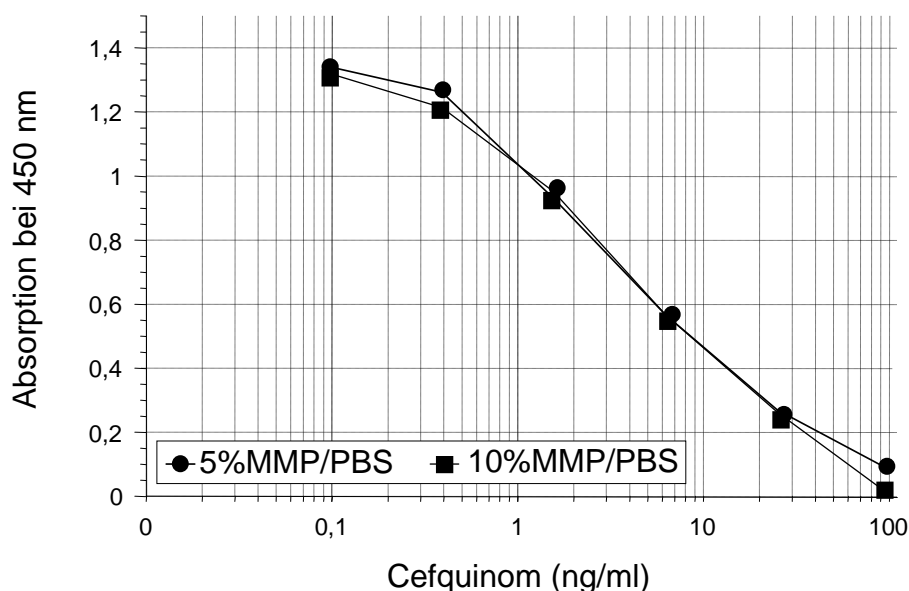


Abbildung 17: Vergleich der Standardkurven für Cefquinom im kompetitiven indirekten Enzymimmuntest: Standardlösungen in 5% Magermilchpulver/PBS (5%MMP/PBS) bzw. in 10% Magermilchpulver/PBS (10%MMP/PBS). Im Meßbereich der Standardkurve (ca. 0,3-0,8 Extinktionseinheiten) waren beide Kurven nahezu deckungsgleich.

Die mittleren 50%-Dosen für in 5% Magermilchpulver/PBS ($3,33 \pm 1,07$ ng/ml) bzw. in 10% Magermilchpulver/PBS ($3,99 \pm 0,87$ ng/ml) unterschieden sich nur unwesentlich voneinander (Abbildung 18). Die Extinktion des Cefquinom-freien Leerwertes erhöhte sich dabei im Vergleich zu reiner Pufferlösung leicht, auf Meßwerte zwischen 1,0 und 1,5 Einheiten, womit eine Verbesserung der Testrobustheit verbunden war. Zur Bestimmung von Cefquinom in Milch wurden alle Probenverdünnungen im Vierfachansatz geprüft, wobei jeweils 3-4 Verdünnungen (bis 1:8) eingesetzt wurden. Zur Auswertung wurden nur solche Meßwerte herangezogen, die einer Extinktion von $>30\%$ (untere Nachweisgrenze) aber $<70\%$ (untere Nachweisgrenze) des Cefquinom-freien Leerwertes entsprachen. Die Variationskoeffizienten für Mehrfachbestimmungen einer Probenverdünnung lagen typischerweise bei 3-7%, Proben mit Variationskoeffizienten von $>10\%$ wurden als nicht auswertbar verworfen. Die Variationskoeffizienten für Meßwerte für zwei oder mehrere verschiedene Verdünnungen einer Probe lagen typischerweise unter 15%.

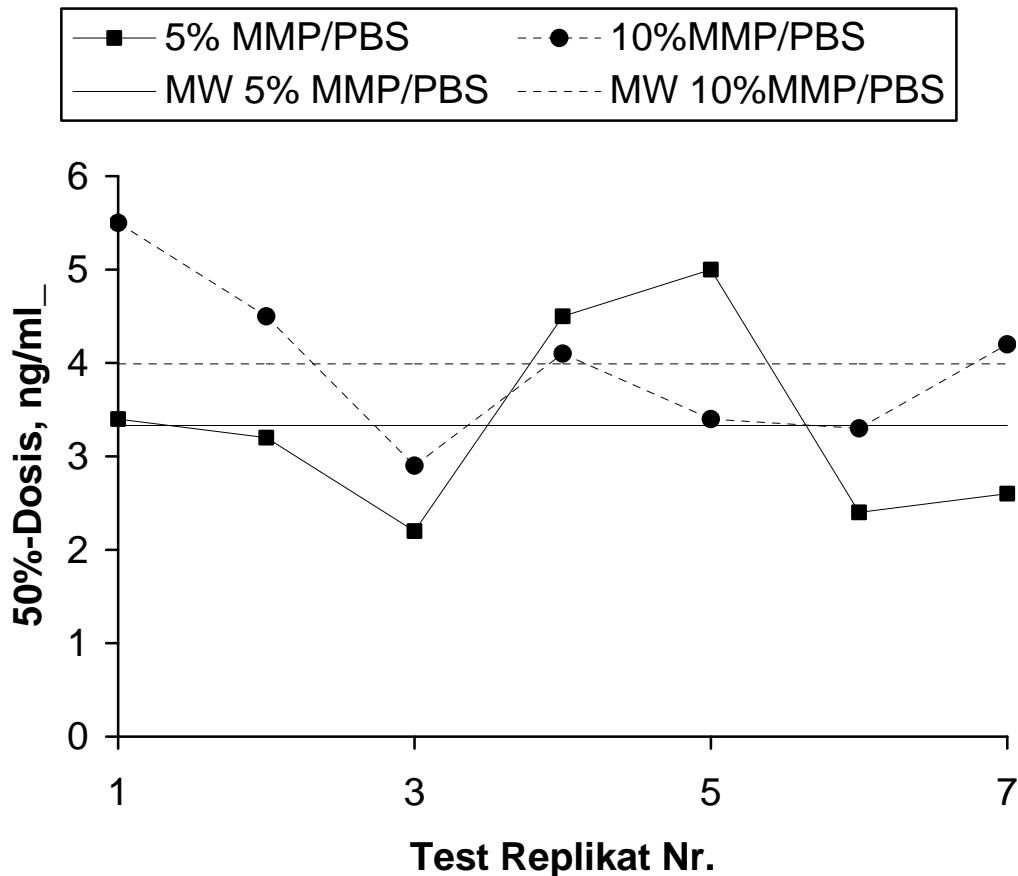


Abbildung 18: Vergleich der 50%-Inhibitionsdosen der Cefquinom-Standardkurve für in 5% Magermilchpulver/PBS (5% MMP/PBS) bzw. 10% Magermilchpulver/PBS hergestellten Cefquinom-Standardlösungen im kompetitiven indirekten Enzymimmuntests (K17, Cefquinom-CD-GOx). Auswertung von jeweils 7 Standardkurven aus einem Zeitraum von ca. 4 Wochen. Die jeweiligen Mittelwerte (MW) sind mittels durchgezogener bzw. gestrichelter Linie gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der Versuche zur Wiederfindung von Cefquinom in künstlich kontaminierter Rohmilch bzw. in künstlich kontaminierter pasteurisierter, homogenisierter Vollmilch sind in den Tabellen 9 bzw. 10 zusammengefasst. Mit mittleren Wiederfindungsraten für Cefquinom-Zusatz auf MRL-Niveau (20 ng/ml) von 86,8% (Rohmilch) bzw. 95% (pasteurisierte Vollmilch) und Variationskoeffizienten um 15% war ein quantitativer Nachweis von Cefquinom in Milch möglich.

Tabelle 9: Wiederfindung von Cefquinom in künstlich kontaminierter Rohmilch

Cefquinom- Zusatz (ng/ml)	Ergebnis Cefquinom				n
	Mittelwert (ng/ml)	Standard- abweichung (ng/ml)	Variations- koeffizient (%)	Wiederfindung (%)	
10	10,3	2,5	23,9	102,9	8
20 (MRL)	17,4	2,7	15,5	86,8	8
40	32,2	2,7	8,4	80,4	8

Tabelle 10: Wiederfindung von Cefquinom in künstlich kontaminierter pasteurisierter, homogenisierter Vollmilch

Cefquinom- Zusatz (ng/ml)	Ergebnis Cefquinom				n
	Mittelwert (ng/ml)	Standard- abweichung (ng/ml)	Variations- koeffizient (%)	Wiederfindung (%)	
10	9,2	1,5	16,9	91,6	8
20 (MRL)	19,0	2,6	13,6	95,0	8
40	37,4	3,8	10,3	93,4	8

5 DISKUSSION

5.1 Anforderungen an ein immunchemisches Testsystem für Cefquinom

In der heutigen Milchwirtschaft stellt die Mastitisprophylaxe bzw. die Mastitisbehandlung einen wichtigen wirtschaftlichen Faktor dar. Hierbei spielt die Gruppe der β -Laktamantibiotika eine herausragende Rolle. Der Einsatz von Cephalosporinen, insbesondere des neueren Wirkstoffs Cefquinom, bei zur Milchgewinnung gehaltenen Kühen nimmt auf Grund guter Wirksamkeit und kurzer Wartezeit zu. Damit steigt auch das Risiko von Rückständen in Milch, woraus sich aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes das Erfordernis eines spezifischen Nachweissystems ergibt. Darüber hinaus sollte die Entwicklung des Eintrags dieser Substanz in die Nahrungskette beobachtet werden.

Die Folgen einer kontinuierlichen oralen Aufnahme geringer Antibiotikamengen, aber auch des Eintrags in die Umwelt sind derzeit nur schwer abschätzbar (MALISCH, 1986; MOATS, 1999). Vor allem die Entstehung bzw. Verbreitung bakterieller Resistenzen in der menschlichen Darmflora dürften hier eine Rolle spielen. Die Cefquinom-Höchstmenge in Milch, die der - auf der Wirkung auf die Darmflora basierenden - tolerierbaren Tagesdosis für Cefquinom entsprechen würde, liegt jedoch nach einer Risikobewertung der EMEA (EMEA, 1993) deutlich höher als die technologische Störgrenze.

Hemmstoffe in Milch und damit auch Rückstände von Cefquinom stellen zudem ein technologisches und somit wirtschaftliches Risiko dar. Die bakterizide Eigenschaft dieser Antibiotika kommt auch in sehr geringen Konzentrationen zum tragen. Starterkulturen, die bei der Herstellung von fermentierten Milchprodukten eingesetzt werden, reagieren oft sehr empfindlich. Dies kann eine Weiterverarbeitung von hemmstoffhaltiger Milch zu z.B. Joghurt oder Käse nachhaltig stören (KNAPPSTEIN et al., 2004; MARTH und ELLICKSON, 1959; SUHREN, 1996; TERPLAN und ZAADHOF, 1967). Für Cefquinom liegt die technologische Störgrenze der empfindlichsten Kulturen bei ca. 20 ng/ml. Bisher liegen zwar noch keine Anhaltspunkte vor, dass dies in der Praxis eine größere Rolle spielen würde. Bei zunehmendem Einsatz, aber auch bei unsachgemäßer Anwendung von Cefquinom bei laktierenden Rindern könnten hier unter Umständen kritische Rückstandskonzentrationen erreicht werden.

Problematisch bei der Bewertung von Rückständen ist derzeit, dass die in der Routinediagnostik eingesetzten Hemmstofftests eine nur unzureichende Empfindlichkeit für Cefquinom im Hinblick auf den MRL-Wert bzw. die minimale technologische Störgrenze aufweisen. Zudem liegen bisher zum Vorkommen von Cefquinom in Anlieferungsmilch bzw. in Konsummilch keine Daten vor. Obwohl letzteres aufgrund von Verdünnungseffekten wohl eher die Ausnahme darstellen dürfte, zumindest im derzeit meßbaren Konzentrationsbereich, stellt das Fehlen eines spezifischen und einfach durchzuführenden Testsystems ein prinzipielles analytisches Defizit dar.

Daher sollte in dieser Arbeit in einem ersten Schritt ein enzymimmunchemisches Verfahren zum Nachweis dieses Wirkstoffes in Milch entwickelt werden. Die Anforderungen an ein solches Testsystem im Hinblick auf die zu erreichende Testsensitivität waren durch den MRL-Wert für Cefquinom in Milch (20 ng/ml) vorgegeben. Aus praktischen Erwägungen heraus leitete sich daraus eine mindestens erreichbare Nachweisgrenze eines solchen Testsystems von $\frac{1}{2} \times \text{MRL}$, d.h. 10 ng/ml, ab. Für mögliche künftige Monitoringuntersuchungen sollte ein solches Testsystem idealerweise jedoch das Potential für einen noch empfindlicheren Nachweis besitzen.

5.2 Antikörper gegen Cefquinom und Entwicklung enzymimmunchemischer Nachweisverfahren

Das Hapten Cefquinom wurde zur Immunogensynthese mittels Glutardialdehyd an das Makromolekül „Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)“ gekoppelt, da mit dieser relativ einfach durchzuführenden und wenig störanfälligen Methode bereits gute Erfahrungen bei der Entwicklung von Antikörpern gegen Penicilline gesammelt worden waren (USLEBER et al., 1998; STRASSER et al., 2003).

Zum Antikörpernachweis in den Seren der immunisierten Kaninchen sowie zur Etablierung eines kompetitiven Enzymimmuntests wurden eine Reihe von markierten Antigenen, unter Einsatz verschiedener Synthesereaktionen, hergestellt. Da bisher noch keine Antikörper gegen Cefquinom beschrieben worden waren, wurden so gleichzeitig erstmals die immunchemischen Eigenschaften solcher Cefquinom-Enzym- bzw. Cefquinom-Protein-Konjugate geprüft. Eine qualitative Überprüfung des Kopplungserfolgs

mittels UV-Spektroskopie ergab für alle Konjugate Unterschiede im Vergleich zu den Reinproteinen im Wellenlängenbereich um 265 nm, der dem Absorptionsmaximum von Cefquinom entsprach. Aufgrund der Tatsache, dass die Orientierung von Cefquinom am Proteinträger unbekannt ist, und wegen möglicher Nebenreaktionen bei den gewählten Synthesereaktionen (z.B. hydrolytische Spaltung des β -Laktamrings) konnte ein praktisch relevanter Erfolg der Konjugation nur im Enzymimmuntest selbst verifiziert werden.

Im Hinblick auf die immunogenen Eigenschaften des hergestellten Cefquinom-GA-KLH Proteins zeigte sich, dass zwar für alle Tiere Antikörpertiter in einem indirekten Testsystem feststellbar waren. Eine kompetitive Inhibition in Anwesenheit von freiem Cefquinom wurde aber im relevanten Konzentrationsbereich von $<1 \mu\text{g/ml}$ nur für die Seren von drei Tieren beobachtet. Bezüglich der durch den MRL für Milch geforderten Testsensitivität schränkte sich die mögliche Auswahl im Hinblick auf den Testaufbau und die Eignung der hergestellten Immunreagenzien im Verlauf der Testoptimierung weiter ein. Ähnlich stark variierende immunchemische Eigenschaften wurden bereits früher für Penicilline berichtet (USLEBER et al., 1998). Auch die eigenen Ergebnisse für Cefquinom zeigten, dass mehrere Tiere immunisiert werden mussten, um von wenigstens einem Tier Antiseren der erforderlichen Qualität zu erhalten.

Zwar konnten mehrere kompetitive direkte und indirekte Enzymimmuntests erstellt werden. Die direkten Testsysteme unter Verwendung von Cefquinom-HRP-Konjugaten erwiesen sich aber, mit Ausnahme eines Systems auf der Basis von Antiserum K17 und Cefquinom-BQ-HRP, entweder als zu wenig robust oder als zu unempfindlich. Selbst für das optimale direkte Testsystem konnte eine Nachweisgrenze für Cefquinom-Standardlösungen von deutlich unterhalb der MRL-Konzentrationen, wie sie für einen Screeningtest sinnvoll wären, nicht erreicht werden. Obwohl der direkte Testaufbau im Hinblick auf die Einfachheit der Testdurchführung prinzipiell Vorteile bietet, wurde daher der Schwerpunkt der weiteren Arbeiten auf die Etablierung eines praxistauglichen kompetitiven indirekten Enzymimmuntest gelegt.

Bei der Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Cefquinom-Protein-Konjugaten nach Standardprotokoll (Verdünnung des Beschichtungsantigens in $0,05 \text{ mol/l}$ Natriumbicarbonat-Puffer, pH 9,6) wurde generell beobachtet, dass nur eine geringe Stabilität der gebrauchsfertigen Platten gegeben war, bei - innerhalb kurzer Zeit zu

beobachtender – Zunahme der Variationskoeffizienten für replikate Messwerte (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies wurde auf negative Effekte durch basische Lösungsmittel zurückgeführt, möglicherweise resultierend in einer hydrolytischen Spaltung von Cefquinom im Proteinträger. Daher wurde in dieser Arbeit eine Verdünnung von Cefquinom-Konjugaten auch zur Beschichtung der Kavitäten von Mikrotiterplatten, in PBS (pH 7,2-7,3) durchgeführt. Damit konnte eine Stabilität der Beschichtung bei Lagerung der Mikrotiterplatten bei 6-8 °C von mindestens 2 Wochen erreicht werden.

Da die vier immunisierten Kaninchen Antiseren mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften produzierten und potentiell brauchbare Kombinationen aus Antiserum und Konjugat für den indirekten Testaufbau recht zahlreich waren, mussten hier aufwendige Versuche zur Optimierung jedes Einzeltests durchgeführt werden, um das analytische Potential jeder Kombination von Immunreagenzien sicher erkennen zu können. Während Antiserum K18 relativ schnell als unbrauchbar identifiziert wurde und auch Antiserum K19 keine praxisrelevante Testqualität zuließ, wurde Antiserum K17 bzw. K20 vertieft untersucht. Hierzu wurden aus Gründen der Teststandardisierung jeweils Seren eines Tieres gleicher Qualität gepoolt.

Im Hinblick auf die Testspezifität zeigte sich erwartungsgemäß, dass keines der getesteten anderen Cephalosporine bzw. Penicilline im Enzymimmuntest für Cefquinom erfasst wurde. Es bestätigten sich damit die Erfahrungen mit Antikörpern gegen Cephalexin und Ceftiofur, die sich ebenfalls als weitgehend spezifisch erwiesen hatten (KITGAWA et al., 1988; KACHAB et al., 1992; STANKER et al., 1998). Für die Antikörpererkennung scheinen demzufolge auch bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Enzymimmuntest für Cefquinom, und im Gegensatz beispielsweise zu generischen Penicillin-Antikörpern (USLEBER et al., 1998; STRASSER et al., 2003), die individuell verschiedenen Seitenketten der Cephalosporine an C3 bzw. C7 entscheidend zu sein.

Das Antiserum K17 ermöglichte die Entwicklung eines hochempfindlichen indirekten Nachweissystems, insbesondere bei Verwendung des Synthese-heterologen Konjugats Cefquinom-CD-GOx. Gute Eigenschaften von GOx als Proteinträger wurden auch für andere kompetitive indirekte Enzymimmuntests beschrieben, beispielsweise für Isoxazolympenicilline (USLEBER et al., 1994; DIETRICH et al., 1996). Während aufgrund der Kopplungsreaktion unter Verwendung von Glutardialdehyd eine Konjugation von

Cefquinom an KLH über die primäre Aminogruppe am Substituenten C7 postuliert werden kann, ist für Cefquinom-CD-GOx eine Kopplung grundsätzlich sowohl über C7 als auch über die freie Carboxylgruppe an C2 möglich. Aufgrund der starken Bindung der Anti-Cefquinom-Antikörper an Cefquinom-CD-GOx ist es jedoch wahrscheinlich, dass auch hier bevorzugt über C7 gekoppelt wurde. Anderenfalls wäre aufgrund stark differierender räumlicher Orientierung des Haptens am Proteinträger keine oder nur noch eine geringe Reaktion zu erwarten. Die Tatsache, dass nur Antiserum von K17 an Cefquinom-CD-GOx gebunden wurde, bei gleichzeitiger möglicher Inhibition dieser Bindung durch freies Cefquinom im Bereich bis <1 ng/ml, unterstreicht die herausragende Immunreaktion dieses Tieres. Die Kombination aus Antiserum K17 und Cefquinom-CD-GOx wurde daher zur Etablierung eines immunchemischen Standardverfahrens weiter entwickelt.

5.3 Anwendbarkeit des Enzymimmuntests

Im kompetitiven indirekten Enzymimmuntest auf der Basis dieser Immunreagenzien konnten gut reproduzierbare Standardkurven für Cefquinom erstellt werden. Mit einem linearen Meßbereich der Standardkurven in einem Bereich von ca. 0,5 ng/ml bis ca. 25 ng/ml wurde der relevante Konzentrationsbereich für dieses Antibiotikum erreicht. Obwohl das Testsystem grundsätzlich Nachweisgrenzen von unter 1 ng/ml erlauben würde, wurde im Hinblick auf die analytischen Anforderungen zunächst ein eher konservativer Ansatz gewählt. Da Probenmatrixeffekte typischerweise zu einer Reduzierung der Farbentwicklung führen, wurde als cut-off-Wert zur Festlegung der Nachweisgrenze der 70%-Inhibitionswert der Standardkurve gewählt. Bei diesem Meßwert können bei der Untersuchung von Milch falsch-positive Ergebnisse erfahrungsgemäß ausgeschlossen werden. In den meisten Fällen entsprach der 70%-Inhibitionswert ungefähr dem 1,6 ng/ml-Standard der Cefquinom-Standardkurve. Aufgerundet gibt sich hieraus eine Nachweisgrenze im Routineeinsatz von ca. 2 ng/ml. Damit ist das hier beschriebene Verfahren das bisher empfindlichste praxistaugliche Screeningverfahren für Cefquinom. Die Empfindlichkeit liegt in einem Bereich, wie er auch für chromatographische Referenzverfahren erreicht wurde (z.B. SUHREN und KNAPPSTEIN, 2003).

Zur Validierung des Testverfahrens wurde Rohmilch und pasteurisierte Konsummilch künstlich mit Cefquinom im Bereich des halben, einfachen und doppelten MRL (10, 20 und 40 ng/ml) dotiert und getestet. Die Wiederfindung für Cefquinom in Rohmilch von 80-103% bzw. in pasteurisierter Konsummilch von 92-95% zeigte, dass nach einem einfachen Entfettungsschritt mittels Zentrifugation eine zuverlässige quantitative Analytik von Cefquinom gegeben ist.

Die eigentliche Testdauer des Enzymimmuntests für Cefquinom liegt bei ca. 2,5 Stunden. Für Screeninguntersuchungen könnte auf die Analyse mehrerer Verdünnungen je Probe verzichtet werden und die Zahl der Replikate je Probe von vier auf zwei reduziert werden. Entsprechend könnten so in etwa einem halben Arbeitstag bei Verwendung von 2 Mikrotiterplatten ca. 70-80 Milchproben untersucht werden.

Ein mögliches Einsatzgebiet des Testsystems könnte eine Ergänzung bestehender integrierter Nachweissysteme für Hemmstoffrückstände in Milch zur Identifizierung und Quantifizierung von Cefquinom sein (HOLTKÖTTER et al., 2002; KERP et al., 2004). Darüber könnte unter Verwendung des hier beschriebenen Enzymimmuntests ein breiter angelegtes Monitoring von Anlieferungsmilchproben durchgeführt werden, da mit den bisher eingesetzten mikrobiologischen Verfahren Rückstände erst in relativ hohen Konzentration >MRL erfasst werden können. Schließlich wäre auch ein Einsatz zur weitergehenden Untersuchung des Ausscheidungsverhaltens von Cefquinom nach verschiedenen Applikationsformen und -dosierungen denkbar. Hierzu wären allerdings zunächst weitere Untersuchungen zur Validierung erforderlich, beispielsweise durch direkten Vergleich mit anderen Analyseverfahren.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit erstmals spezifische Antikörper gegen Cefquinom hergestellt und in einem enzymimmunochemischen Nachweissystem implementiert werden. Die Anwendbarkeit dieses Testsystems für Rückstandsuntersuchungen in Milch konnte anhand künstlich kontaminierter Milchproben belegt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis des Cephalosporinantibiotikums Cefquinom in Milch. Hierzu wurden erstmals spezifische Antikörper gegen Cefquinom hergestellt. Zur Herstellung eines immunogenen Cefquinom-Protein-Konjugats wurde Cefquinom mittels Glutardialdehyd an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) gekoppelt (Cefquinom-GA-KLH). Mit diesem Konjugat wurden 4 Kaninchen immunisiert. Die gewonnenen Antiseren wurden jeweils im Hinblick auf spezifische Antikörpertiter überprüft und diejenigen Antiseren mit den besten Testeigenschaften einer weiteren Charakterisierung unterzogen.

Zur Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntests wurde Cefquinom unter Verwendung verschiedener Kopplungsreagenzien bzw. Synthesereaktionen an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Unter Verwendung von Anti-Cefquinom-Antiserum eines Tieres (K17) sowie eines mittels p-Benzoquinon-Kopplung hergestellten Konjugates (Cefquinom-BQ-HRP) konnte ein Testsystem erarbeitet werden, das den Nachweis von Cefquinom mit einer Nachweisempfindlichkeit im Bereich des MRL für Cefquinom von 20 ng/ml erlaubte.

Für die Entwicklung eines kompetitiven indirekten enzymimmunologischen Nachweisverfahrens wurde Cefquinom unter Verwendung verschiedener Kopplungsreagenzien bzw. Synthesereaktionen an Trägerproteine (bovines Serumalbumin, BSA, Glucose Oxidase, GOx) konjugiert. Unter Verwendung eines mittels Glutardialdehydkopplung hergestellten Cefquinom-GA-BSA-Konjugates oder eines mittels wasserlöslichem Carbodiimid (CD) hergestellten Cefquinom-CD-GOx-Konjugates konnten unter Verwendung der Antiseren zweier Tiere (K17, K20) Enzymimmuntests etabliert werden.

Die höchste Testsensitivität wies eine Kombination aus Antiserum K17 und Cefquinom-CD-GOx-Konjugat als Beschichtungsantigen auf. Diese Kombination wurde als Standardverfahren für den Nachweis von Cefquinom etabliert. Hier konnten Nachweisgrenzen für Cefquinom-Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 1-2 ng/ml erreicht werden. Das Testsystem war hochspezifisch und wies keine meßbaren Kreuzreaktionen mit 25 getesteten anderen Cephalosporinen bzw. Penicillinen auf.

Die Überprüfung der praktischen Anwendbarkeit des Nachweissystems zum Nachweis von Cefquinom anhand künstlich kontaminierter Rohmilch bzw. pasteurisierter Konsummilch zeigte, dass im Konzentrationsbereich des MRL (10, 20 bzw. 40 ng/ml) Wiederfindungsraten von 80-103% erreichbar waren. Hierzu wurden die Cefquinom-Standardlösungen in 5% (Konsummilch) bzw. 10% (Rohmilch) Magermilchpulverlösung/PBS) hergestellt.

Der in dieser Arbeit entwickelte Test ermöglicht somit die Identifizierung und Quantifizierung von Cefquinom in Milch, mit vergleichbarer Empfindlichkeit wie für physikalisch-chemische Referenzverfahren beschrieben wurde.

7. SUMMARY

The presented study describes the development of an enzyme immunoassay (EIA) for the detection of the cephalosporin antibiotic cefquinome in milk samples. For this purpose it was necessary to develop specific antibodies against cefquinome, which to our knowledge had not been achieved before. To create an immunogenic complex, we had to bind cefquinome to the protein keyhole limpet hemocyanin which was accomplished using glutardialdehyde (Cefquinome-GA-KLH). We inoculated 4 rabbits with this immunogenic conjugate. The received sera were tested for specificity and the best sera were further characterized.

For the development of a competitive direct EIA, cefquinome was bound to horseradish peroxidase (HRP) using different coupling substances and several methods of synthesis. A test was developed with the serum of one rabbit (No 17) against cefquinome and a p-benzoquinone bound conjugate of cefquinome and HRP. This test was able to detect cefquinome in the range of the maximum residue limit (MRL) of 20 ng/ml.

For the development of a competitive indirect EIA, cefquinome was coupled to anchor proteins like bovine serum albumin (BSA) and glucose oxidase (GOx). This was achieved using different binding substances and methods. An EIA was developed with the sera of two rabbits (No. 17 and 20) and cefquinome-GA-BSA as well as with a conjugate of cefquinome, carbodiimidazole (CD) and GOx.

The test with a combination of the serum of rabbit No. 17 and Cefquinome-CD-GOx had the greatest sensitivity. With this combination a standard test for the detection of cefquinome was established. The lowest detectable amount of cefquinome standard was 1-2 ng/ml. The EIA was highly specific for cefquinome and no cross reactivity was observed against 25 different cephalosporins and penicillins.

The practical applicability of this EIA for the detection of cefquinome was verified with artificially contaminated raw milk and pasteurized milk. The milk was inoculated with 10, 20 and 40 ng/ml cefquinome which lies in the range of the MRL. The recovery rate was about 80 to 103%. The cefquinome standard was dissolved in 5% (pasteurized milk) and in 10% (raw milk) skimmed milk-powder/PBS.

With the EIA that was developed in this study, it is possible to identify and quantify cefquinome in milk with the same sensitivity as physical-chemical reference tests.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ABRAHAM, E. P. und G. G. F. NEWTON (1961):

The structure of cephalosporin C

Biochem. J. **79**, 377-393

ABRAHAM, E. P. (1983):

History of β -lactam antibiotics

In: DEMAIN, A. L. und N. A. SOLOMON (Herausgeber): Antibiotics containing the beta-lactam structure, 1-14

Springer Verlag, Berlin

ADKINSON, N. F. (1990):

Side-chain specific beta-lactam allergy

Clin. Exp. Allergy **20**, 445-447

AIM (Analytik in Milch Produktions- und Vertriebs-GmbH), München (2004):

Nachweisempfindlichkeiten der AiM BRT Testsysteme gegenüber ausgewählten Antiinfektiva in Kuhmilch

Produktinformation

ALLEN, J. C. (1989):

The value of immunoassays to food analysis

In: RITTENBURG, J. H. (Herausgeber): Development and application of immunoassay for food analysis, 59-77

Elsevier Applied Science, London

AMIRIDIS, G. S., G. C. FTHENAKIS, J. DAFOPOULOS, T. PAPANIKOLAOU und V. S. MAVROGIANNI (2003):

Use of cefquinome for prevention and treatment of bovine endometritis

J. Vet. Pharmacol. Ther. **26**, 387-390

ANDREW, S. M. (2000):

Effect of fat and protein content of milk from individual cows on the specificity rates of antibiotic residue screening tests

J. Dairy Sci. **83**, 2992-2997

ANDREW, S. M., R. A. FROBISH, M. J. PAAPE und L. J. MATURIN (1997):

Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes

J. Dairy Sci. **80**, 3050-3057

ARTS, C. J. M., E. M. L. GEIJP, J. STARK und R. F. WITKAMP (2005):

The Premitest, a broad-spectrum screening test for the detection of antimicrobial compounds in meat, organs and urine

Produktinformation

AUDICANA, M., G. BERNAOLA, I. URRUTIA, S. ECHECHIPIA, G. GASTAMINZA, D. MUNOZ, E. FERNANDEZ und D. C. FERNANDEZ (1994):

Allergic reactions to betalactams: studies in a group of patients allergic to penicillin and evaluation of cross-reactivity with cephalosporin

Allergy **49**, 108-113

AVRAMEAS, S. (1969):

Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies

Immunochem. **6**, 43-52

AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK (1969):

The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents

Immunochem. **6**, 53-66

AXEN, U. (1974):

N,N'-Carbonyldiimidazole as coupling reagent for the preparation of bovine serum albumin conjugates

Prostaglandins **5**, 45-47

BALDO, B. A. (1999):

Penicillins and cephalosporins as allergens--structural aspects of recognition and cross-reactions

Clin. Exp. Allergy **29**, 744-749

BALDO, B. A., Z. ZHAO und N. H. PHAM (2001):

Structural determinants of antibiotic allergy

Curr. Allergy Rep. **1**, 23-31

BECKER, W. (1976):

Zur Möglichkeit einer Allergisierung und Auslösung allergischer Erscheinungen nach oraler Aufnahme von antibiotikahaltigen Lebensmitteln

Archiv für Lebensmittelhygiene **27**, 181-185

BECKER, M., E. ZITLLAU und M. PETZ (2004):

Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Analytical Chimica Acta **520**, 19-32

BERRUGA, M. I., R. L. ALTHAUS, M. YAMAKI, M. P. MOLINA und A. MOLINA (2004):

Detection of cephalosporin residues in milk from treated ewes by screening tests

Milchwiss. **59**, 660-663

BERZOFSKY, J. A. und A. N. SCHECHTER (1981):

The concepts of crossreactivity and specificity in immunology

Mol. Immunol. **18**, 751-763

BEYER, F. (1986):

Hemmstoffe in Milch aus technologischer Sicht

Deutsche Molkereizeitung **27**, 898-899

BJÖRCK, L. und E. HOPKIN (1994):

Significance of the indigenous antimicrobial agents of milk to the dairy industry

IDF **264**, 2-19

BLANCA, M., J. FERNANDEZ, A. MIRANDA, S. TERRADOS, M. J. TORRES, J. M.

VEGA, M. J. AVILA, E. PEREZ, J. J. GARCIA und R. SUAUI (1989):

Cross-reactivity between penicillins and cephalosporins: clinical and immunologic studies

J. Allergy Clin. Immunol. **83**, 381-385

BLANCA, M., C. MAYORGA, M. J. TORRES, R. WARRINGTON, A. ROMANO, P.

DEMOLY, F. SILVIU-DAN, M. MOYA, J. FERNANDEZ und C. JUAREZ (2002):

Side-chain-specific reactions to betalactams: 14 years later

Clin. Exp. Allergy **32**, 192-197

BLANCA, M., M. J. TORRES, C. MAYORGA und A. PADIAL (2003):

Penicillin allergy is a global problem: the European experience

J. Allergy Clin. Immunol. **112**, 1014-1015

BOBBIT, D. R. und K. W. NG (1992):

Chromatographic analysis of antibiotic materials in food

J. Chromatogr. **624**, 153-170

BOISON, J. O. (1992):

Chromatographic methods of analysis for penicillins in food-animal tissues and their significance in regulatory programs for residue reduction and avoidance

J. Chromatogr. **624**, 171-194

BOOTH, J. M. und F. HARDING (1986):

Testing for antibiotic residues in milk

Vet. Rec. **119**, 565-569

BÖTTNER, A., P. SCHMID und R. HUMKE (1995):

In vitro efficacy of cefquinome (INN) and other antiinfective drugs against bovine bacterial isolates from Belgium, France, Germany, The Netherlands and the United Kingdom

J. Vet. Med. B **42**, 377-383

BOYD, D. B. (1983):

Substituent effects in cephalosprins as assessed by molecular orbital calculations, nuclear magnetic resonance and kinetics

J. Med. Chem. **26**, 1010-1013

BOYD, D. B., R. B. HERMANN, D. E. PRESTI und M. M. MARSH (1975):

Electronic structures of cephalosporins and penicillins. 4. Modeling acylation by the beta-lactam ring

J. Med. Chem. **18**, 408-417

BRACHT, T. (2004):

Gefährliche Gegner

ÖKO-Test **1**, 72-75

BRADY, M. S., N. WHITE und S. E. KATZ (1993):

Resistance development potential of antibiotic/antimicrobial residue levels designated as "safe levels"

J. Food Prot. **56**, 229-233

BRENTROP H. und E. ALBERS (1995):

Hemmstoffe in der Anlieferungsmilch- Praxisbericht über einen beachtenswerten Kontaminationsweg

Praktischer Tierarzt **1**, 53-56

BROTZU, G. (1948):

Richerche su di un nuovo antibiotico

Lavori dell'istituto D'Igiene di Cagliari, 1-11

BRUNO, F., R. CURINI, A. DI CORCIA, M. NAZZARI und R. SAMPERI (2001):

Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of beta-lactam antibiotics in bovine milk

J. Agric. Food Chem. **49**, 3463-3470

BUNDGAARD, H. (1976):

Chemical studies related to cephalosporin allergy

Acta Pharm. Suec. **13**, 299-312

CARLSSON, A., und L. BJÖRCK (1987):

The effect of some indigenous antibacterial factors in milk on the growth of *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*

Milchwiss. **42**, 282-285

CARLSSON, A., L. BJÖRCK und G. JOHNSON (1992):

The use of different microbial assays in combination with the Charm II Test in the detection of antibiotic residues in herd milk

Int. Dairy J. **2**, 109-119

CHARM, S. E. und R. CHI (1988):

Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: collaborative study

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71**, 304-316

CHIN, N. X., J. W. GU, W. FANG und H. S. NEU (1992):

In vitro activity of cefquinome, a new cephalosporin, compared with other cephalosporin antibiotics

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **15**, 331-337

CLIQUET, P., E. COX, C. VAN DORPE, E. SCHACHT und B. M. GODDEERIS (2001):
Generation of class-selective monoclonal antibodies against the penicillin group
J. Agric. Food Chem. **49**, 3349-3355

CORTI, S., D. SICHER, W. REGLI und R. STEPHAN (2003):
Aktuelle Daten zur Antibiotikaresistenz der wichtigsten bovinen Mastitiserreger in der
Schweiz
Schweizer Archiv der Tierheilkunde **145**, 571-575

CULLOR, J. S. (1993):
On-farm antibiotic testing
Western Large Herd Manangement Conference, Las Vegas, 57-63

DAVIES, G. M., P. B. HITCHCOCK, D. LOAKES und D. W. YOUNG (1996):
Synthesis of reactive γ -lactams related to penicillins and cephalosporins
Tetrahedron Lett. **37**, 5601-5604

DE HAAN, P., D. M. BOORSMA und G. L. KALSBECK (1979):
Penicillin hypersensitivity. Determination and classification of anti-penicillin antibodies by
the enzyme-linked immunosorbent assay
Allergy **34**, 111-119

DEBACKERE, M. (1995):
Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of antimicrobials in relation to their residues in
milk
IDF, Symposium on residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk, Kiel
Tagungsband, 41-53

DEGELAEN, J. (1994):
Hemmstoffnachweis in Milch
Deutsche Milchwirtschaft **13**, 593-596

DEMAIN, A. L. und R. P. ELANDER (1999):

The beta-lactam antibiotics: past, present, and future

Antonie Van Leeuwenhoek **75**, 5-19

DEWDNEY, J. M. und R. G. EDWARDS (1984):

Penicillin hypersensitivity - is milk a significant hazard?: a review

J. R. Soc. Med. **77**, 866-877

DEWDNEY, J. M., L. MAES, J. P. RAYNAUD, F. BLANC, J. P. SCHEID, T.

JACKSON, S. LENS und C. VERSCHUEREN (1991):

Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential

Food. Chem. Toxicol. **29**, 477-483

DIETRICH, R., E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1996):

Use of monoclonal antibodies for the detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk,

In: HAAGSMA, N. und A. RUITER (Herausgeber): Euro Residue III: conference on residues of veterinary drugs in food, 382-386

University of Utrecht

DIETRICH, R., E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1998):

The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins

Analyst **123**, 2749-2754

DISERENS, J.-M. (2002):

Schnelltestmethoden

Arbeitsgruppe pharmakologisch wirksamer Stoffe der Gesellschaft deutscher Chemiker,

Nestlé Research Centre

Lausanne, Schweiz

DOUGLAS, D., R. MARKOVSKY, G. RUTH, S. SAUL und R. SALTER (2003):
 The new Charm SL-6 β -Laktam test detects all required β -Laktam drugs within 30% of
 safe level tolerances
 42nn Annual Meeting of the National Mastitis Council, 26.-29. Januar
 Ft. Worth, Texas

DSM FOOD SPECIALITIES, Delft, Niederlande (1999):
 Delvotest-X-Press β -Laktame II
 Produktinformation

DSM FOOD SPECIALITIES, Delft, Niederlande (2002a):
 BR-Test AS Brillant
 Produktinformation

DSM FOOD SPECIALITIES, Delft, Niederlande (2002b):
 Delvotest SP
 Produktinformation

EKINS, R. (1989):
 Shadow over immunoassay
 Nature **340**, 256-258

EMEA/MRL/005/95 (1995):
 The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Committee for veterinary
 Medical Products, Cefquinome Summary Report

EMEA/MRL/405/98-FINAL APRIL 1998 (1998):
 The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Committee for veterinary
 Medical Products, Cefquinome Summary Report (1)

EMEA/MRL/545/99-FINAL JANUAR 1999 (1999):
 The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Committee for veterinary
 Medical Products, Cefquinome Summary Report (2)

EMEA/MRL/883/03-FINAL JULY 2003 (2003a):

The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Committee for veterinary Medical Products, Cefquinome Summary Report (3)

EMEA/CVMP/765/99-REV.12 SEPTEMBER 2003 (2003b):

Status of MRL procedures, MRL assessments in the context of Council Regulation (EEC) No 2377/90

ENGVAL, E. und P. PERLMANN (1971):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Quantitative assay of immunoglobulin G

Immunochem. **8**, 871-874

ERRECALDE, C. A., G. F. PRIETO, I. PUELLES, C. F. LÜDERS und H. G. OVANDO (2002):

Farmacocinética de cefquinome en terneros por aplicación intramuscular

Rev. Col. Cienc. Pec. **15**, 281-285

FABRE, J. M., J. P. MORETAIN, F. ASCHER, P. BROUILLET und X. BERTHELOT (1995):

Main causes of inhibitors in milk - a survey of one thousand french dairy farms

IDF, Symposium on residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk, Kiel

Tagungsband, 27-31

FECKNER, T., J. E. BALDWIN, R. M. ADLINGTON, T. W. JONES, C. K. PROUT und C. J. SCHOFIELD (2000):

Syntheses of (6S)-Cephalosporins from 6-aminopenicillanic acid

Tetrahedron **56**, 6053-6074

FLEMING, A. (1929):

On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae

Brit. J. of Exp. Pathologie **10**, 226-236

FLOß, M. (1997):

Anwendung enzymimmunchemischer Testsysteme zum Nachweis von Penicillin G und Penicillin G-Metaboliten in Kuhmilch nach therapeutischer Applikation

Diss. med. vet. München

FRÈRE, J. M., D. KLEIN und J. M. GHUYSEN (1980):

Enzymatic method for rapid and sensitive determination of beta-lactam antibiotics

Antimicrob. Agents Chemother. **18**, 506-510

FRIEDRICH C. und W. D. MÜLLER-JAHNKE (1996):

Vom Schimmelpilz zur modernen Antibiotikatherapie

Deutsche Apothekerzeitung **42**, 57-62

GALLATI, H. und I. PRACHT (1985):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-

Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **23**, 453-460

GANIERE, J. P., C. MEDAILLE und C. MANGION (2005):

Antimicrobial Drug Susceptibility of Staphylococcus intermedius Clinical Isolates from Canine Pyoderma

J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health **52**, 25-31

GAUDIN, V., P. MARIS, R. FUSELIER, J. L. RIBOUCHON, N. CADIEU und A.

RAULT (2004):

Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk

Food Addit. Contam. **21**, 422-433

GEDEK, W. (1973):

Ausscheidung von Antibiotika mit der Milch

Tierärztliche Praxis **1**, 245-251

GEDEK, W. (1977):

Erfassung von Cephalosporinen in Rohmilch durch B.-cereus-Beta-Lactamase
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **84**, 340-342

GEDEK, W. (1984):

Hemmstoffe in der Milch: Alte und neue Frage
Deutsche Molkereizeitung **50**, 1779-1787

GEDEK, W. (1986):

Problematik der Antibiotika- und Desinfektionsmittelrückstände in der Milch im
Zusammenhang mit Mastitistherapie und -prophylaxe - Hemmstoffe in Milch aus
tierärztlicher Sicht
Deutsche Molkereizeitung **27**, 894-897

GEISEL, R. und F.-J. SCHMITZ (2000):

Aufbau, Funktion und Verbreitung von Integrons als mobile Überträger von
Antibiotikaresistenzgenen
Der Mikrobiologe **10**, 201-207

GILBERTSON T.J., R. L. MEJEUR, F. S. YEIN und P. S. JAGLAN (1995):

Modified microbiological method for the screening of antibiotics in milk
J. Dairy Sci. **78**, 1032-1038

GOLDFARB, A. R., L. J. SAIDEL und E. MOSOVIC (1951):

The ultraviolet absorption spectra of proteins
J. Biol. Chem. **193**, 397-404

GOLINSKI, M., H. SCHWEITZER und W. PABST (2003):

Jahresbericht 2003, 1-99
Hessischer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht

GOMEZ, M. B., M. J. TORRES, C. MAYORGA, E. PEREZ-INESTROSA, R. SUAUA, M. I. MONTANEZ und C. JUAREZ (2004):

Immediate allergic reactions to betalactams: facts and controversies
Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. **4**, 261-266

GRÄFE, U. (1992):

Biochemie der Antibiotika, 246-361
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

GUÉRIN-FAUBLÉE, V., G. CARRET und P. HOUFFSCHMITT (2003):

In vitro activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis
Vet. Rec. **152**, 466-471

HAMILTON-MILLER, J. M. (1976):

Lysis by beta-lactam antibiotics: structure-activity relationships in the cephalosporins
J Appl Bacteriol **41**, 419-424

HARLE, D. G. und B. A. BALDO (1990):

Drugs as allergens: an immunoassay for detecting IgE antibodies to cephalosporins
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **92**, 439-444

HEESCHEN, W. und G. SUHREN (1986):

Zur Stellung eines mikrobiellen Rezeptortests (Charm II) in einem System zum Nachweis und zur Identifizierung antibiotisch wirksamer Hemmstoffe in Milch
Milchwiss. **41**, 749-753

HEESCHEN, W. H. und G. SUHREN (1996):

Principles of and practical experiences with an integrated system for the detection of antimicrobials in milk
Milchwiss. **51**, 154-160

HEINRITZI, K. und J. HAGN (1999):

Untersuchung zur Wirksamkeit und Verträglichkeit des neu entwickelten Cephalosporins Cefquinom bei an puerperaler Septikämie und Toxämie erkrankter Sauen
Tierärztliche Praxis **27**, 114-121

HILLERTON, J. E., B. I. HALLEY, P. NEAVES und M. D. ROSE (1999):

Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using Delvotest microbial inhibitor tests
J. Dairy Sci. **82**, 704-711

HÖBART, G., P. WINTER, W. BAUMGARTNER (2004):

Wirksamkeit von Cefquinom in der Behandlung boviner Mastitiden - Eine Feldstudie
Tierärztliche Umschau **59**, 718-724

HOLSTEGE, D. M., B. PUSCHNER, G. WHITEHEAD und F. D. GALEY (2002):

Screening and mass spectral confirmation of beta-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS
J. Agric. Food Chem. **50**, 406-411

HOLTKÖTTER, C., B. KERP, E. SCHNEIDER, A. STRASSER, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER und E. USLEBER (2002):

Anwendung eines integrierten Analysensystems zur Differenzierung, Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotikarückständen in Milch
In: 43. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 417-421

HOU, J. P. und J. W. POOLE (1971):

β -Laktam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure
J. Pharm Sci. **60**, 503-532

HUTH, S. P., P. S. WARHOLIC, J. M. DEVOU, L. K. CHANEY und G. H. CLARK
(2002):

Parallux beta-lactam: a capillary-based fluorescent immunoassay for the determination of penicillin-G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, cephapirin, and ceftiofur in bovine milk
J. AOAC Int. **85**, 355-364

INTERVET (2002a):

Die Wirkformel für Rind und Schwein

Produktinformation

INTERVET (2002b):

Der Durchbruch bei Arthritis, Epidermitis, Meningitis

Produktinformation

INTERVET (2004a):

Cobactan[®] 2,5 %

Produktinformation

INTERVET (2004b):

Cobactan[®] LC

Produktinformation

INTERVET (2005):

Cobactan[®] DC

Produktinformation

JOCKERS, R., F. F. BIER und R. D. SCHMID (1993):

Enhancement of immunoassay sensitivity by molecular modification of competitors

J. Immunol. Methods **163**, 161-167

JÜLICHER, B. (1992):

Tierarzneimittelrückstände und Lebensmittelüberwachung - Auswirkungen des EG-Rechts
Gesundheitsblatt **35**, 281-286

KACHAB, E. H., W.-Y. WU und C. B. CHAPMAN (1992):

The development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for cephalixin
J. Immunol. Meth. **147**, 33-41.

KELKAR, P. S. und J. T. LI (2001):

Cephalosporin allergy
N. Engl. J. Med. **345**, 804-809

KERP, B., C. KRESS, C. SEIDLER, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2004):

Erfahrungen bei der Anwendung eines Identifizierungs- und Quantifizierungssystems für
Antibiotikarückstände in Milch

In: 45. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen
Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen,
Tagungsbericht, Druck in Vorbereitung

KIRST, E. (1992):

Auswirkungen von Einflüssen auf die Verarbeitungseigenschaft der Milch
Milchpraxis **30**, 190-194

KITAGAWA ,T., Y. GOTOH, K. UCHIHARA, Y. KOHRI, T. KINOUE, K. FUJIWARA
und W. OHTANI (1988):

Sensitive enzyme immunoassay of cephalixin residues in milk, hen tissue, and egg
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71**; 915-920

KLEIN, G. (1999):

Lebensmittel als potentielle Vektoren für Antibiotikaresistenzen - 1. Mitteilung: Bedeutung
von Rückständen und ausgewählten Lebensmittelinfektions- und -intoxikationserregern
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **112**, 365-369

KLUGE, K. und F. R. UNGEMACH (1998):

Neue Arzneimittel für Pferde und landwirtschaftliche Nutztiere und Veränderungen auf
dem Arzneimittelmarkt
Tierärztliche Praxis **26**, 301-306

KNAPPSTEIN, K., G. SUHREN und H.-G. WALTE (2003a):

Influences of milking intervals and frequencies in automatic milking systems on excretion characteristics of different antibiotics in milk

EU-Programm QLK5-2000-31006, **D11**, 1-58

KNAPPSTEIN, K., G. SUHREN und H.-G. WALTE (2003b):

Influence of milking frequency on withdrawal period after application of beta-lactam antibiotic-based drugs

Analytical Chimica Acta **483**, 241-249

KNAPPSTEIN, K., G. SUHREN, H.-G. WALTE, B. A. SLAGHUIS und R. T.

FERWERDA- VAN ZONNEVELD (2004):

Appropriate management of antibiotic treatment of cows in automatic milking systems

EU-Programm QLK5-2000-31006, **D12**, 1-37

KNAPPSTEIN, K., G. SUHREN und H.-G. WALTE (2005):

Influence of milking frequency on withdrawal period after application of beta-lactam antibiotic-based drugs

Kieler Milchwissenschaftliche Forschungsberichte **57**, 215-261

KRAACK, J. und A. TOLLE (1967):

Brillantschwarz-Reduktionstest mit Bac. stearotherophilus var. calidolactis zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch

Milchwiss. **22**, 669-637

KROKER, R., W. LÖSCHER, J. SIMUNEK, H. TROLLDENIER und F. R. UNGEMACH (1996):

Chemotherapie bakterieller Infektionen

In: FREY, H. -H. und W. LÖSCHER: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 454-532

Enke Verlag, Stuttgart

KROLL, S. (2000):

Zur Eignung von Schnelltestverfahren zum Rückstandsnachweis von Beta-laktam-Antibiotika in Milch

Diss. med. vet. München

KROLL, S., E. USLEBER, K.-J. ZAADHOF, E. SCHNEIDER und E. MÄRTLBAUER (1999):

Vergleichsuntersuchung kommerzieller Schnelltests für Betalaktam-Antibiotika in Milch

In: 40. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen,

Tagungsbericht, 330-336

KUHN, D., P. IMMING, C. IMMING, D. DETTMERING und D. DIX (1999):

Neue Waffen gegen neue Feinde

Pharmazeutische Zeitung **43**, 1-11

KURZ, S., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1994):

Entwicklung eines gruppenspezifischen Enzymimmuntests für β -Laktam-Antibiotika

In: 35. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen,

Tagungsbericht, 207-213

LESSEL, J. (1996):

Penicillin-bindende Proteine: Das Target der β -Laktam-Antibiotika - Wirkmechanismus von β -Laktamasen und deren Inhibitoren

Pharmazie in unserer Zeit **25**, 17-27

LIMBERT, M., D. ISERT, N. KLESEL, A. MARKUS, K. SEEGER, G. SEIBERT und E. SCHRINNER (1991):

Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin

Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 14-19

LOCHBIHLER, E., E. USLEBER, G. TERPLAN, G. ENGELHARDT und P. WALLNÖFER (1995):

Untersuchungen zum Vorkommen von Antibiotika und Sulfonamiden in bayerischer Konsummilch mittels enzymimmunologischer Verfahren

Archiv für Lebensmittelhygiene **46**, 60-62

LOHR, B., B. BRUNNER und K. HELLMANN (2004):

Praxisrelevante Ergebnisse einer Umfrage zum Einsatz von Cobactan 2,5% bei Tieren

Tierärztliche Umschau **59**, 1-3

MALISCH, R. (1986):

Rückstände von pharmakologisch wirksamen Stoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft

Deutsche Lebensmittelrundschau **82**, 353-357

MARTH, E. H. (1966):

Antibiotics in foods-naturally occurring, developed, and added

Residue Rev. **12**, 65-161

MARTH, E. H. und B. E. ELLICKSON (1959):

Problems created by the presence of antibiotics in milk and milk products

J. Milk Food Technol. **22**, 266-272

MÄRTLBAUER, E. (1993):

Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe

Die Deutsche Bibliothek, 1-230

Enke Verlag; Stuttgart

MÄRTLBAUER, E. (1995):

Die Hemmstoffproblematik aus der Sicht der Analytik

Milchwirtschaftliche Berichte **124**, 115-119

MÄRTLBAUER, E., R. MEIER, E. USLEBER und G. TERPLAN (1992):

Enzyme immunoassays for the detection of sulfamethazine, sulfadiazine, sulfamethoxy-pyridazine and trimethoprim in milk

Food Agric. Immunol. **4**, 219-227

MASON, I. S. und M. KIETZMANN (1999):

Cephalosporins-pharmacological basis of clinical use in veterinary dermatology

Vet. Dermatology **10**, 187-192

MILCHPRÜFRING BAYERN E.V. (2005):

Tätigkeitsbericht

MITCHELL, J. M., M. W. GRIFFITHS, S. A. MCEWEN, W. B. MCNAB und A. J. YEE (1998):

Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance

J. Food Prot. **61**, 742-756

MITCHELL, M. J. und A. J. YEE (1995):

Antibiotic Use in Animals and Transfer of Drug Resistance to Humans: Should we stop treating Animals with These Drugs?

Dairy Food Environ. Sanitation **15**, 484-487

MOATS, W. A. (1999):

The effect of processing on veterinary residues in foods

Adv. Exp. Med. Biol. **459**, 233-241

MOL, H. (1975):

Antibiotics and milk, 1-133

A. A. Balkema, Rotterdam

MORETAIN, J. P. und C. FROGER (1995):

Penzym 100 und Penzym 50 durch AFNOR validiert

Dtsch. Milchwirtsch. **46**, 1341-1343

MORIN, R. B., B. G. JACKSON, E. H. FLYNN und R. W. ROESKE (1962):

Chemistry of cephalosporin antibiotics

J. Am. Chem. Soc. **84**, 3400-3401

MUIR, D. D. und N. WEST (1999):

Survey of antibiotic test methods for raw milk

Commissioned by the dairy industry federation

Hannah Research institute

Manufacturer's sensitivity declaration

COPAN P&S Single and P&S Microplate (Stand Oktober 2001)

Produktinformation

MUTSCHLER, E. (1996):

Arzneimittelwirkungen, 7. Auflage, 658-675

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

NAZINA, T. N., T. P. TOUROVA, A. B. POLTRARAUS, E.V. NOVIKOVA, A.A.

GRIGORYAN, A. E. IVANOVA, A. M. LYSENKO, V. V. PETRUNYAKA, G. A.

OSIPOV, S. S. BELYAEV und M. V. IVANOV (2001):

Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**, 433-446

NEAVES, P. (1999):

Monitoring antibiotics in milk - the changing world of test methods

British Mastitis Conference, Internetausdruck 2004

www.iah.bbsrc.ac.uk/bmc/1999

NGO, T. T. und H. M. LENHOFF (1982):

Enzymes as versatile labels and signal amplifiers for monitoring immunochemical reactions

Mol. Cell. Biochem. **44**, 3-12

NIESCHLAG, E., H. K. KLEY und K.-H. USADEL (1975):

Production of steroid antisera in rabbits

In: CAMERON, E. H. D. , S. G. HILLIER und K. GRIFFITH (Herausgeber): Steroid Immunoassay, Proceedings of the Tenovus Workshop 5 **XI**, 87-96

NOSEK, J. (1997):

Produktion von β -Laktamantibiotika durch Mikroorganismen

Chemie unserer Zeit **31**, 172-182

NOUWS, J. F., H. VAN EGMOND, I. SMULDERS, G. LOEFFEN, J. SCHOUTEN und H. STEGEMAN (1999a):

A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels

Int. Dairy Journal **9**, 85-90

NOUWS, J. F., H. VAN EGMOND, G. LOEFFEN, J. SCHOUTEN, H. KEUKENS, I. SMULDERS und H. STEGEMAN (1999b):

Suitability of the Charm HVS and a microbiological multiplate system for detection of residues in raw milk at EU maximum residue levels

Vet. Q. **21**, 21-27

NOVALBOS, A., J. SASTRE, J. CUESTA, H. M. DE LAS, M. LLUCH-BERNAL, C. BOMBIN und S. QUIRCE (2001):

Lack of allergic cross-reactivity to cephalosporins among patients allergic to penicillins
Clin. Exp. Allergy **31**, 438-443

OELLERICH, M. (1984):

Enzyme-immunoassay: a review

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **22**, 895-904

ORDEN, J. A., J. A. RUIZ-SANTA-QUITERIA, S. GARCIA, D. CID und F. R. DE LA (1999):

In vitro activities of cephalosporins and quinolones against Escherichia coli strains isolated from diarrheic dairy calves

Antimicrob. Agents Chemother. **43**, 510-513

OSTERMAIER, S. (1994)

Entwicklung und Anwendung von enzymimmunologischen Schnelltestverfahren zum Nachweis von Sulfonamiden in Milch

Diss. med. vet. München

PENZYM (1994):

Schnellnachweis für Beta-Laktam-Antibiotika

Chr. Hansen`s Heute

Produktinformation

PERRETEN, V., F. SCHWARZ, L. CRESTA, M. BOEGLIN, G. DASEN und M. TEUBER (1997):

Antibiotic resistance spread in food

Nature **389**, 801-802

PETZ, M. (1993):

Tierarzneimittel-Rückstände in Lebensmitteln - Ein Überblick

Lebensmittelchemie **47**, 26-31

PHAM, N. H. und B. A. BALDO (1996):

β -Laktam drug allergens: fine structural recognition patterns of cephalosporin-reactive IgE antibodies

J. Mol. Recognition **9**, 287-296

PORSTMANN, T. und S. T. KIESSING (1992):

Enzyme immunoassay techniques -An overview

J. Immunol. Methods **150**, 5-21

RIEDIKER, S. und R. H. STADLER (2001):

Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry

Anal. Chem. **73**, 1614-1621

RITTENBURG J.H. (1989):

Fundamentals of immunoassays

In: RITTENBURG, J. H.(Herausgeber): Development and application of immunoassay for food analysis, 29-58

Elsevier Applied Science, London

ROLINSON, G. N. (1979):

6-APA and the development of the β -Laktam antibiotics

J. Antimicrob. Chemother. **5**, 7-14

ROLINSON, G. N. (1998):

Forty years of beta-lactam research

J. Antimicrob. Chemother. **41**, 589-603

ROMANO, A., R. M. GUEANT-RODRIGUEZ, M. VIOLA, R. PETTINATO und J. L. GUEANT (2004):

Cross-reactivity and tolerability of cephalosporins in patients with immediate hypersensitivity to penicillins

Ann. Intern. Med. **141**, 16-22

ROSE, M., P. SCHMID und A. BÖTTNER (1996):

Zur Anwendung von Cefquinom beim Rind: Konzentrationsverlauf im Bronchialsekret und in-vitro Wirksamkeit gegenüber Pasteurella spp.

Tierärztliche Praxis **51**, 760-765

RUSSEL, A. S. und M. H. LESSOF (1971):

Hypersensitivity to drugs

Clin. Allergy **1**, 179-187

SCHÄLLIBAUM, M. (1986a):

Kontamination der Milch mit Antibiotikarückständen - Situationsanalyse Schweiz

Deutsche Molkereizeitung **24**, 784-786

SCHÄLLIBAUM, M. (1986b):

Nachweis von Antibiotikarückständen in Milch mit dem Charm-Test

Deutsche Molkereizeitung **24**, 787-788

SCHÄLLIBAUM, M. (1989):

Antibiotikatherapie und Rückstände in der Ablieferungsmilch

Swiss Food **12**, 7-9

SCHENK, F. J. (1998):

Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk

J. Chromatogr. A **812**, 99-109

SCHLIEPHAKE, A. (1998):

A comparative study of a newly developed agar-diffusion test and the brilliant-black reduction test in conjunction with an elisa-reader to measure antibiotic residues in milk

Milchwiss. **53**, 88-90

SCHLÖSSER, J., M. STRAKA, E. USLEBER und M. PETZ (2000):

Antibodies against a bacterial cell wall peptide as a tool for residue analysis of beta-lactam and glycopeptide antibiotics

Residues of veterinary drugs in food, RIVM, Bilthoven/Niederlande, 131-136

SCHMID, P. und V. THOMAS (2002):

Cefquinome-eight years antimicrobial susceptibility surveillance in cattle

Produktinformation, INTERVET, XXII World Buiatrics Congress

SCHMITT, M. (2002):

Lebensmittelhygiene in Deutschland und Europa - Aktueller Stand und Entwicklung von gesetzlichen Forderungen und Richtlinien

Deutsche Molkereizeitung. **5**, 180-182

SCHNAPPINGER, P., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1993):

Enzyme immunoassay for the detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk.

Food Agric. Immunol. **5**, 67-73

SCHNEIDER, E., E. MÄRTLBAUER, R. DIETRICH, E. USLEBER und G. TERPLAN (1994):

Zwei immunchemische Schnelltests zum Nachweis von Chloramphenicol in Rohmilch

Archiv für Lebensmittelhygiene **45**, 25-48

SCHOLZ, H. (2001):

Stellungnahme zu: Gruppeneinteilung der Oralcephalosporine

Chemotherapie Journal **10**, 153-154

SCHOLZ, H., K. G. NABER und DIE EXPERTENGRUPPE DER PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT FÜR CHEMOTHERAPIE E.V. (2000):

Einteilung der Oralcephalosporine

Medizinische Monatsschrift der Pharmakologie **23**, 2-5

SCHRÖDER, A., M. HOEDEMAKER und G. KLEIN (2005):

Resistenzen von Mastitiserregern im norddeutschen Raum

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **118**, 393-398

SCHWARZ, S. und E. CHASLUS-DANCLA (2001):

Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance

Vet. Res. **32**, 201-225

SHAH, P. M. (2001):

Gruppeneinteilung der Oralcephalosporine

Chemotherapie Journal **10**, 148-152

SHELDON, I. M., M. BUSHNELL, J. MONTGOMERY und A. N. RYCROFT (2004):

Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle

Vet. Rec. **155**, 383-387

SHIPGEL, N. Y. und P. SHMID (1997):

Ein Beitrag zur Behandlung der akuten Mastitis des Rindes mit Cefquinom

Tierärztliche Praxis **25**, 200-206

SIMON, C. und W. STILLE (1993):

Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis, 29-106

Schattauer Verlag, Stuttgart

SMITH, C. J. (1989):

Evolution of the Immunoassay

In: RITTENBURG, J. H. (Herausgeber): Development and application of immunoassay for food analysis, 3-27

Elsevier Applied Science, London

SØRENSEN, L. K. und L. K. SNOR (2000):

Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography

J. Chromatogr. A **882**, 145-151

SPINKS, C. A. (2000):

Broad-specific immunoassay of low molecular weight food contaminants: new path to utopia

Trends in Food Science & Technology **11**, 210-217

STAHLMANN, R. und H. LODE (2001):

Antibiotika und Chemotherapeutika

In: FORTH W. , D. HENSCHLER, W. RUMMEL, U. FÖRSTERMANN und K. STARKE (Herausgeber): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage, 791-828

Urban & Fischer Verlag, München

STANKER, L. H., S. A. BUCKLEY, M. MULDOON, W. A. MOATS und C.

BRASWELL (1998):

A Monoclonal Antibody-based Immunoassay for the Detection of Ceftiofur in Milk
Food Agric. Immunol. **10** , 121-131

STEAD, S., M. SHARMAN, J. A. TARBIN, E. GIBSON, S. RICHMOND, J. STARK und E. GEIJP (2004):

Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products

Food Addit. Contam. **21**, 216-221

STRASSER, A., E. USLEBER, E. SCHNEIDER, R. DIETRICH, C. BÜRK und E. MÄRTLBAUER (2003):

Improved enzyme immunoassay for group-specific detection of penicillins in milk
Food Agric. Immunol. **15**, 135-143

SUHREN, G. (1996):

Untersuchungen zum Einfluß von Rückständen von antimikrobiell wirksamen Substanzen in Milch auf kommerziell eingesetzte Starterkulturen in Modellversuchen
Kieler Milchwissenschaftliche Forschungsberichte **48**, 131-149

SUHREN, G. (2002):

Hemmstoffe und Tierarzneimittelrückstände in Milch - rechtliche Grundlagen, Nachweisverfahren, Untersuchungssysteme
Kieler Milchwissenschaftliche Forschungsberichte **54**, 35-71

SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1990):

Zum Nachweis von β -Laktam-Antibiotika in Milch mit Cite-Test, Agardiffusionsverfahren und mikrobiellem Rezeptortest
Deutsche Molkereizeitung **24**, 784-788

SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1996):

Detection of inhibitors in milk by microbial tests. A review
Nahrung **40**, 1-7

SUHREN, G. und J. REICHMUTH (1998a):

Nachweis von β -Laktamantibiotikarückständen in Milch - Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-Laktamtest
Deutsche Molkereizeitung **14**, 674-681

SUHREN, G. und J. REICHMUTH (1998b):

Screening-Verfahren zum Nachweis von β -Laktamantibiotikarückständen in Milch
In: 39. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 584-589

SUHREN, G. und K. KNAPPSTEIN (2003):

Detection of cefquinome in milk by liquid chromatography and screening methods
Analytical Chimica Acta **483**, 363-372

SUHREN, G., J. REICHMUTH und H.-G. WALTE (1996a):

Detection of β -Lactam antibiotics in milk by the penzyme-test

Milchwiss. **51**, 269-273

SUHREN, G., H.-G. WALTE und W. HEESCHEN (1996b):

Zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Rückstände in Milch auf der Tankwagenebene

In: 37. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen,

Tagungsbericht, 315-323

TERNYNCK, T. und S. AVRAMEAS (1976):

A new method using p-benzoquinone for coupling antigens and antibodies to marker substances

Ann. Immunol. (Paris) **127**, 197-208

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1967):

Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch - eine kurze Übersicht

Milchwiss. **22**, 761-771

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1975):

Antibiotika, Hormone und Thyreostatika in Lebensmitteln tierischer Herkunft sowie ihre Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit

Deutsches Ärzteblatt **6**, 344-350

TEUFEL, P. (1998):

Jahresbericht

BAFM, Institut für Hygiene und Produktsicherheit, Kiel

TEUFEL, P. (2003):

Jahresbericht

BAFM, Institut für Hygiene und Produktsicherheit, Kiel

TROLLDENIER, H. und A. ESCHER (1978):

Beziehungen zwischen tierärztlicher Anwendung von Chemotherapeutika und hemmstofffreier Rohmilch

Monatshefte der Veterinärmedizin **33**, 421-425

TROLLDENIER, H. (1999):

Zur Resistenzproblematik in der Veterinärmedizin - Übersicht aus bundesweit erfassten Daten

Tierärztliche Praxis **27**, 317-323

USLEBER, E., S. LITZ und E. MÄRTLBAUER (1998):

Production and characterization of group-specific antibodies against penicillin antibiotics

Food Agric. Immunol. **10**, 317-324

USLEBER, E., E. MÄRTLBAUER, E. SCHNEIDER und R. DIETRICH (1994a):

Enzymimmuntests zum Nachweis von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs - eine Übersicht

Archiv für Lebensmittelhygiene **45**, 25-48

USLEBER, E., M. LORBER, M. STRAKA, G. TERPLAN und E. MÄRTLBAUER (1994b):

Enzyme immunoassay for the detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk

Analyst **119**, 2765-2768

USLEBER, E., R. DIETRICH, A. STRASSER, K.-J. ZAADHOF und E. MÄRTLBAUER (2000):

Substanzdifferenzierung von betalaktam-Antibiotika in Hemmstoff-positiven Milchproben unter Verwendung von Rezeptor- und Enzymimmuntests

In: 41. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen,

Tagungsbericht, 220-225

VALIO Ltd, Helsinki, Finnland (2004):

T101-Test for detecting antimicrobial residues in milk

Produktinformation

VAN EENENNAAM, A. L., J. S. CULLOR, L. PERANI, I. A. GARDNER, W. L.

SMITH, J. DELLINGER, W. M. GUTERBOCK und L. JENSEN (1993):

Evaluation of milk antibiotic residue screening tests in cattle with naturally occurring clinical mastitis

J. Dairy Sci. **76**, 3041-3053

VEGA, J. M., M. BLANCA, M. J. CARMONA, J. GARCIA, A. CLAROS, C. JUAREZ und M. C. MOYA (1991):

Delayed allergic reactions to beta-lactams. Four cases with intolerance to amoxicillin or ampicillin and good tolerance to penicillin G and V

Allergy **46**, 154-157

VOGEL, F., K.-F. BODMANN und DIE EXPERTENKOMMISSION DER PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT FÜR CHEMOTHERAPIE E.V.(PEG) (2004):

Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen

Arzneimitteltherapie **22**, 271-281

WALSER, K. (1979):

Ausscheidungs- und Rückstandsprobleme nach therapeutischer Anwendung von Antibiotika und Sulfonamiden beim Rind

Tierärztliche Umschau **34**, 232-242

WALTE, H.-G. (1996):

Nachweis von β -Laktamantibiotikarückständen in Milch mit mikrobiologischen und enzymatischen tests

In: 37. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen,

Tagungsbericht, 337-342

WILSON, B. M. und P. K. NAKANE (1976):

The covalent coupling of proteins to Periodate-oxidized sephadex: a new approach to immunoadsorbent preparation

J. Immunol. Methods **12**, 171-181

WINTER, P., G. HOBARTH und W. BAUMGARTNER (2003):

Einsatz von Cefquinom in der Mastitistherapie

Vet-MedReport **27**, 1+13

WONG, S. S. (1993):

Chemistry of protein conjugation and cross-linking,

CRC Press, 23-25

Boca Raton, Florida

XIAO, H., J. R. CLARKE, R. R. MARQUARDT und A. A. FROHLICH (1995):

Improved Methods for Conjugating Selected Mycotoxins to Carrier Proteins and Dextran for Immunoassays

J. Agric. Food Chem. **43**, 2092-2097

ZAADHOF, K.-J., E. MÄRTLBAUER, A. VORREITER und L. SCHWEIZER (1997):

Zur Eignung kommerzieller mikrobiologischer Hemmstofftests als Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis

Archiv für Lebensmittelhygiene **48**, 127-132

ZHAO, Z., B. A. BALDO und J. RIMMER (2002):

beta-Lactam allergenic determinants: fine structural recognition of a cross-reacting determinant on benzylpenicillin and cephalothin

Clin. Exp. Allergy **32**, 1644-1650

ZOMER, E. und T. LIEU (1996):

Performance of a broad spectrum anti-microbial drug inhibition assay (AIM96) in an inter-laboratory collaborative study in bulk raw milk

Milchwiss. **51**, 696-698

Zitierte Gesetze, Verordnungen, Richtlinien, amtliche Untersuchungsverfahren

Arzneimittelgesetz (AMG) vom 24. August 1976 in Geltung ab 6. Juni 1986. Neugefasst durch die Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (I 3394).

BGBI I 1976, 2445, 2448

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) vom 1. September 2005. Neugefasst durch die Bekanntmachung vom 26. April 2006 (I 945).

BGBI I 2005, 2618, (3007)

Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (Milchverordnung) vom 24. April 1995. Umsetzung der EWGRL 46/92, EWGRL 47/92, EWGRL 662/89, EWGRL 675/90, EGEntsch 70/94, EWGEntsch 13/93, EWGEntsch 14/93, EGRL 71/94, EGEntsch 408/95, EGEntsch 340/95, EGEntsch 343/95 und EGRL 23/96. Neugefasst durch die Bekanntmachung vom 20. Juli 2000 (I 1178) und zuletzt geändert durch Artikel 5 V vom 9. November 2004 (I 2791).

BGBI I 1995, 544

Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. Zuletzt aktualisiert durch Verordnung (EG) Nr. 1055/2006 der Kommission vom 12. Juli 2006 zur Änderung der Anhänge I und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 192 vom 13.7.2006, 3–5

Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG.

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 125 vom 23.05.1996, 10-32

Richtlinie 96/23/EG des Rates über die Rückstandsüberwachungspläne. Zuletzt geändert durch die Entscheidung 2006/208/EG der Kommission vom 7. März 2006 zur Änderung der Entscheidung 2004/432/EG.

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 75 vom 14.3.2006, 20–25

Entscheidung 97/747/EG der Kommission vom 27. Oktober 1997 über Umfang und Häufigkeit der in der Richtlinie 96/23/EG des Rates vorgesehenen Probenahmen zum Zweck der Untersuchung in bezug auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände in bestimmten tierischen Erzeugnissen

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 303 vom 6.11.1997

Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 3. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte.

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 273, 1-160

Verordnung (EG) 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und Verordnung (EG) 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates über Vorschriften über Lebensmittelhygiene und für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 322/2006 der Kommission vom 23. Februar 2006.

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 54 vom 24.2.2006, 3–4

ANHANG I: Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

		Seite
Tabelle 1	Höchstmengen (Maximum Residue Limit, MRL) für Cefquinom in Lebensmitteln tierischen Ursprungs nach Verordnung (EWG) Nr. 2377/90, Anhang I	6
Tabelle 2	Empfindlichkeit einiger Starterkulturen gegenüber Penicillin G (modifiziert nach: MARTH, 1966; MARTH und ELLICKSON, 1959; TERPLAN und ZAADHOF, 1967; SUHREN, 1996)	16
Tabelle 3	Nachweisgrenzen kommerziell erhältlicher Testverfahren für Cefquinom in Milch (MRL = 20 µg/kg)	34
Tabelle 4	Eingesetzte Reaktionsmengen bei der Kopplung von Cefquinom an Makromoleküle mittels Glutardialdehyd	42
Tabelle 5	Verdünnung der Immunreagenzien für kompetitive direkte Enzymimmuntests unter Verwendung von Cefquinom-HRP-Konjugaten	53
Tabelle 6	Eingesetzte Cefquinom-Proteinkonjugate im kompetitiven indirekten Enzymimmuntest und getestete Verdünnungsstufen der Immunreagenzien	55
Tabelle 7	Zur Ermittlung der Testspezifität des Enzymimmuntests für Cefquinom überprüfte β-Laktamantibiotika	56
Tabelle 8	Referenzdaten der kompetitiven indirekten Enzymimmuntests für Cefquinom unter Verwendung optimierter Kombinationen aus Antiserum und Beschichtungsantigen	69
Tabelle 9	Wiederfindung von Cefquinom in künstlich kontaminierter Rohmilch	75
Tabelle 10	Wiederfindung von Cefquinom in künstlich kontaminierter pasteurisierter, homogenisierter Vollmilch	75

	Seite
Abbildung 1	10
<p>Vergleich der chemischen Grundstruktur (IUPAC-Nomenklatur) der Penicilline („Penam-Grundkörper“ der 6-Aminopenicillinsäure, links) und der Cephalosporine („3-Cephem-Grundkörper“ der 7-Aminocephalosporansäure, rechts). Beide weisen einen β-Laktamring (A) auf, der bei den Penicillinen mit einem 5-gliedrigen Thiazolidonring (B) und bei den Cephalosporinen mit einem 6-gliedrigen Dihydrothiazinring (C) verknüpft ist. Penicilline sind (mit Ausnahme der Langzeitpenicilline) meist nur an der 6-Aminogruppe (R1) substituiert, während Cephalosporine üblicherweise Substituenten an der 7-Aminogruppe (R1) sowie an der 3-Methylgruppe (R2) aufweisen.</p>	
Abbildung 2	11
<p>Vergleich der Strukturformeln von Cephalosporin-Antibiotika, die für einen Einsatz bei laktierenden Kühen zugelassen sind. Neben dem Substanznamen ist jeweils der MRL-Wert für Milch ($\mu\text{g/kg}$) angegeben.</p>	
Abbildung 3	40
<p>Strukturformel von Cefquinom. Die möglichen Kopplungsstellen zur Synthese von Cefquinom-Proteinkonjugaten sind mit A (Aminogruppe des Substituenten an C7) bzw. B (Carboxylgruppe im 3-Cephemring an C2) gekennzeichnet.</p>	
Abbildung 4	41
<p>Schematische Darstellung der Kopplung von Cefquinom (CEF) an Proteinträger mittels Glutardialdehyd als homobifunktionalem Reagenz.</p>	
Abbildung 5	43
<p>Schematische Darstellung der beiden möglichen Kopplungsreaktionen von Cefquinom (CEF) an Trägerproteine mittels wasserlöslichem Carbodiimid (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid).</p>	
Abbildung 6	44
<p>Schematische Darstellung der Kopplung von Cefquinom (CEF) an Trägerproteine unter Verwendung von 1,1-Carbonyldiimidazol als Kopplungsreagenz.</p>	
Abbildung 7	45
<p>Schematische Darstellung der Kopplung von Cefquinom (CEF) and Meerrettichperoxidase mittels reduktiver Alkylierung (Perjodatmethode).</p>	

	Seite
Abbildung 8	47
Schematische Darstellung der Kopplung von Cefquinom (CEF) an Meerrettichperoxidase mittels p-Benzoquinon.	
Abbildung 9	52
Beispiel für die Plattenbelegung zur Durchführung der Hemmtitration zur Ermittlung der optimalen Konzentration der Immunreagenzien für Cefquinom.	
Abbildung 10	60
Typisches UV-Absorptionsspektrum von Cefquinom in A. dest (10µg/ml).	
Abbildung 11	60
Vergleich der UV-Spektren für Cefquinom-GA-HRP (1:10 in PBS) und HRP-Reinprotein-Lösung (125 µg/ml in PBS) sowie resultierendes Differenzspektrum.	
Abbildung 12	61
Vergleich der UV-Spektren für Cefquinom-CD-BSA (1:70 in PBS) und BSA-Reinprotein-Lösung (200 µg/ml in PBS) sowie resultierendes Differenzspektrum.	
Abbildung 13	62
Relative Antiserumstiter der mit Cefquinom-KLH immunisierten Kaninchen nach Überprüfung im kompetiven indirekten Testsystem unter Verwendung von Cefquinom-CD-GOx als Festphasenantigen.	
Abbildung 14	65
Typische Standardkurve des kompetitiven direkten Enzymimmuntests für Cefquinom unter Verwendung von Antiserum K17 (1:500 Verdünnung in PBS) und Cefquinom-BQ-HRP-Konjugat (1:100 Verdünnung in 1% Casein/PBS 1:100). Die Intra-assay Standardabweichungen für Replikate der einzelnen Standardkonzentrationen (n=4) lagen unter 10%, die 50%-Dosis lag bei 50 ng/ml. Die Nachweisgrenze lag bei 20 ng/ml. Die Extinktion des Leerwertes betrug 1,0 Einheiten, die höchste Cefquinomkonzentration (1µg/ml) führte zu einem Extinktionswert von 0,18 Einheiten.	

	Seite
Abbildung 15	70
<p>Vergleich der Standardkurven der kompetitiven indirekten Enzymimmuntests für Cefquinom unter Verwendung der Antiseren K17 (Pool), K19 (Woche 39) bzw. K20 (Pool) in der für jedes Antiserum optimierten Kombination (Tabelle 8) mit Beschichtungsantigen (Cefquinom-Protein-Konjugat). Die Absorptionswerte des Cefquinomfreien Leerwertes (B_0) lagen jeweils zwischen 0,8 und 1,0 Einheiten.</p> <p>K17: Antiserum Verdünnung 1:300, Cefquinom-CD-GOx 1:3040</p> <p>K19: Antiserum Verdünnung 1:400, Cefquinom-GA-BSA 1:11334</p> <p>K20: Antiserum Verdünnung 1:200, Cefquinom-GA-BSA 1:11334</p>	
Abbildung 16	71
<p>Charakteristische Standardkurve des optimierten kompetitiven indirekten Enzymimmuntests für Cefquinom (Antiserum K17 Pool, Cefquinom-CD-GOx). Die 50%-Dosis der Standardkurve beträgt 2,1 ng/ml, die Nachweisgrenze liegt bei 1 ng/ml. Die Absorptionswerte des Cefquinomfreien Leerwertes (B_0) Extinktionen lag bei 1,0 Einheiten, die maximal erzielbare Inhibition durch Cefquinom (100 ng/ml) resultierte in 0,07 Extinktionseinheiten.</p>	
Abbildung 17	72
<p>Vergleich der Standardkurven für Cefquinom im kompetitiven indirekten Enzymimmuntest: Standardlösungen in 5% Magermilchpulver/PBS (5% MMP/PBS) bzw. in 10% Magermilchpulver/PBS (10% MMP/PBS). Im Meßbereich der Standardkurve (ca. 0,3-0,8 Extinktionseinheiten) waren beide Kurven nahezu deckungsgleich.</p>	

Abbildung 18 Vergleich der 50%-Inhibitionsdosen der Cefquinom-Standardkurve für 74
in 5% Magermilchpulver/PBS (5% MMP/PBS) bzw. 10%
Magermilchpulver/PBS hergestellten Cefquinom-Standardlösungen im
kompetitiven indirekten Enzymimmuntests (K17, Cefquinom-CD-
GOx). Auswertung von jeweils 7 Standardkurven aus einem Zeitraum
von ca. 4 Wochen. Die jeweiligen Mittelwerte (MW) sind mittels
durchgezogener bzw. gestrichelter Linie gekennzeichnet.

ANHANG II: Verzeichnis der Abkürzungen

ad. inj.	ad injectionem
ADI	acceptable daily intake
BQ	para-Benzoquinon
BRT	Brillantschwarz-Reduktionstest
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Carbodiimid
CDI	Carbonyldiimidazol
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	The European Agency for the Evaluation of Medical Products
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
GC	Gaschromatographie
GOx	Glukoseoxidase
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
i.E.	internationale Einheit
KGW	Körpergewicht
LC	Flüssigkeitschromatographie
LFBG	Lebensmittel-und Futtermittelgesetzbuch
MRL	maximum residue limit (gesetzlich erlaubte nachweisbare Höchstmenge des jeweiligen Hemmstoffs)
MS	Massenspektrometrie
NOEL	no observed effect level (maximale Dosis ohne beobachtbaren Effekt)
PBP	Penicillin bindendes Protein
PBS	phosphate buffered solution (Phosphatpufferlösung)
PJ	Perjodat
ssp.	Subspezies

Mein tief empfundener Dank gilt Herrn Professor Dr. E. Usleber für die Überlassung des Themas und die geduldige Unterstützung bei kleinen und großen Problemen. Für die ständige Ansprechbarkeit, die tatkräftige Betreuung und seine unerschöpfliche Geduld bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. E. Schneider möchte ich besonders danken für die tatkräftige Hilfe und dafür, dass sie immer den Überblick behalten hat. Auch Julia Charlotte gilt in diesem Zusammenhang mein Dank, dass sie ihrer Mutter noch Zeit und Nerven für die aufwendige und sorgfältige Korrektur gelassen hat.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meiner Kollegin Bianca Kerp und allen anderen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die mit Rat und Tat zur Seite standen und immer ein offenes Ohr und eine helfende Hand übrig hatten.

Dank sage ich auch Dr. Wolfgang Seufert für schnelle und hilfreiche Reaktionen im chemischen Bereich, Dr. Thorsten Johnson für sprachliches und meiner Frau Kristin Thal, dafür dass sie mir den Rücken freigehalten und gestärkt hat, in guten wie in schlechten Zeiten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5097-5



9 783835 950979 ®